



Etude des interactions hôte-parasite dans le cadre d'infections par des microsporidies, un groupe de champignons parasites intracellulaires obligatoires

Johan Panek

► To cite this version:

Johan Panek. Etude des interactions hôte-parasite dans le cadre d'infections par des microsporidies, un groupe de champignons parasites intracellulaires obligatoires. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2015. Français. NNT : 2015CLF22618 . tel-01295048

HAL Id: tel-01295048

<https://theses.hal.science/tel-01295048>

Submitted on 30 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D. U. 2618

UNIVERSITE D'AUVERGNE
N° d'ordre : 678

**ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

Thèse:

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : écologie

Soutenue le 12 novembre 2015

Johan PANEK

**Etude des interactions hôte-parasite dans le cadre
d'infections par des microsporidies, un groupe de
champignons parasites intracellulaires obligatoires.**

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Roberts P. HIRT, Professeur
Institute for Cell and Molecular Biosciences, Newcastle

Mme. Isabelle FLORENT, Professeur
Museum National d'Histoire Naturelle, Paris

Examineurs:

Luc Belzunces DR, INRA, Avignon

Directeurs de thèse:

M. Hicham EL ALAOU, MCU, LMGE, Clermont-Ferrand
M. David G. BIRON, CR1 CNRS, LMGE, Clermont-Ferrand

Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement
UMR CNRS 6023, équipe Interactions Hôtes-Parasites

Remerciements

Je souhaite avant toute chose remercier Robert P. Hirt et Isabelle Florent pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Luc Belzunces pour avoir également accepté d'examiner mon travail.

Je remercie M. Téléphore SIME-NGANDO, Directeur du Laboratoire Microorganismes Génome et Environnement (LMGE, UMR CNRS 6023) pour m'avoir accueilli au sein du LMGE.

Je remercie également M. Frédéric DELBAC, responsable de l'équipe Interactions Hôtes-Parasites (IHP) pour m'avoir fait confiance et avoir accepté de m'intégrer dans l'équipe qu'il dirige.

Mes remerciements vont aussi à Hicham EL ALAOUI et David G. BIRON pour la qualité de leur encadrement et le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de cette thèse qui m'a, je pense, permis de progresser.

Je tiens aussi à remercier Serge Urbach et Edith Demettré de la plateforme de protéomique de Montpellier pour leur aide précieuse lors de l'analyse des données SILAC ainsi que de la réalisation du premier article. Je remercie également Christelle Soubeyrand-Damon et Bernard Vignes pour leur aide sur la partie histologie qui a été très longue mais qui aurait pu durer plus longtemps sans leurs précieux conseils.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe IHP qui m'ont aidé au cours de cette thèse ainsi que tous ceux qui ont contribué à la bonne réalisation de cette dernière et que j'aurais oubliés.

Je remercie également tous les membres de ma famille qui m'ont supporté et ont cru en moi lorsque j'ai voulu reprendre mes études en première année.

Et enfin, Elisabeth qui a toujours été là pour me soutenir au long de ces trois années de thèse qui n'ont pas toujours été faciles (surtout à la fin) et qui a accepté de me suivre pour la suite de cette aventure à San Diego !

SOMMAIRE

Chapitre I:	Introduction générale	1
Chapitre II:	Bibliographie	5
1.	Les interactions hôte-parasite	6
1.1.	Le mode de vie parasitaire	6
1.2.	Les différents types de parasitismes.....	7
1.3.	L'évolution du mode de vie parasitaire	8
1.3.1.	La coévolution.....	8
1.3.2.	Le filtre de rencontre.....	10
1.3.3.	Le filtre de compatibilité	11
1.3.3.1.	Stratégies d'échappement passif au système immunitaire.....	12
1.3.3.2.	Stratégies d'échappement actif au système immunitaire.....	12
2.	Les microsporidies: un modèle d'interaction minimale hôte-parasite	14
2.1.	150 ans de recherche sur les microsporidies	14
2.2.	Caractères morphologiques.....	15
2.2.1.	La spore.....	15
2.2.2.	Ultrastructure de la spore	16
2.3.	Cycle de vie	18
2.3.1.	La germination	19
2.3.2.	La mérogonie	20
2.3.3.	La sporogonie.....	21
2.4.	Un bon modèle d'interaction hôte-parasite	22
2.4.1.	Des parasites ubiquistes	22
2.4.2.	Des génomes compacts et réduits.....	23
3.	Les modèles de microsporidies étudiés au cours de ma thèse	25
3.1.	<i>Anncaliia algerae</i> – cellules fibroblastiques humaines : un modèle cellulaire	25
3.1.1.	<i>Anncaliia algerae</i>	25
3.1.1.1.	Cycle de vie.....	26
3.1.2.	Interaction avec l'hôte.....	27
3.2.	Le modèle <i>Nosema ceranae</i> – <i>Apis mellifera</i>	28
3.2.1.	L'abeille un modèle d'intérêt	28

3.2.1.1.	Un insecte présent dans le monde entier	28
3.2.1.2.	Un rôle écologique et économique important.....	29
3.2.1.3.	Le déclin de l'abeille mellifère	30
3.2.1.4.	Les différents facteurs impliqués dans les pertes de colonies	30
3.2.1.4.1.	Les facteurs abiotiques	31
3.2.1.4.2.	Les facteurs biotiques	31
3.2.2.	<i>Nosema ceranae</i> un acteur probable du déclin de l'abeille	33
3.2.2.1.	<i>Nosema ceranae</i> et <i>N. apis</i> deux pathogènes responsables de la nosémose	33
3.2.2.2.	<i>Nosema ceranae</i> remplace-t-elle <i>Nosema apis</i> ?	34
3.2.2.3.	Biologie et cycle de vie de <i>Nosema ceranae</i>	35
3.2.3.	L'interaction <i>Nosema ceranae</i> – <i>Apis mellifera</i>	36
3.2.3.1.	Immunité individuelle	36
3.2.3.1.1.	Immunité cellulaire.....	37
3.2.3.1.2.	Immunité humorale	37
3.2.3.1.3.	Immunité sociale	38
3.2.3.2.	Impact de la nosémose sur la santé de l'abeille	39
3.2.3.2.1.	Stress énergétique	39
3.2.3.2.2.	Perturbation de l'homéostasie hormonale.....	40
3.2.3.2.3.	Suppression de l'immunité	41
4.	Problématique.....	43
Chapitre III:	<i>Outils "omics" et approches protéomiques pour décrypter le dialogue moléculaire entre un parasite et son hôte.....</i>	45
Chapitre IV:	<i>Décryptage du dialogue moléculaire entre une microsporidie et son hôte à l'échelle cellulaire</i>	58
Chapitre V:	<i>Etude du protéome de l'intestin d'abeille en réponse à l'infection par <i>Nosema ceranae</i> par 2D-DIGE.....</i>	71
Chapitre VI:	<i>Impact de l'infection par <i>Nosema ceranae</i> sur le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal de l'abeille.....</i>	82
Chapitre VII:	<i>Conclusion et perspectives</i>	102
1.	Niveau cellulaire – interaction <i>A. algerae</i>-Cellules HFF (Chapitre IV).....	103
2.	Niveau tissulaire – interactions <i>N. ceranae</i>-<i>A. mellifera</i> (Chapitre V et VI)	105
3.	Vers l'interactomique	107

Chapitre VIII: Bibliographie110

Chapitre IX: Annexe126

Abréviations:

2D-DIGE:	two-dimensional differential in gel electrophoresis
ADN:	Acide DesoxyriboNucléique
AMPs:	Antimicrobial Peptides
ANR:	Agence Nationale de la Recherche
ARN:	Acide RiboNucléique
ARNi:	ARN interference
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adénosine Tri-Phosphate
CCD:	Colony Collapse Disorder
CMV:	CytomégaloVirus
DWV:	Deformed Wing Virus
EGFR:	Epidermal Growth Factor Receptor
EIF3:	Elongation Initiation Factor 3
EROs:	Espèces Oxygénées Réactives
ET:	Élément Transposable
FAO:	Food and Agriculture Organization
GAG:	Glycosaminoglycanes
GST:	Gluthatione-S-Transferase
HFF:	Human Foreskin Fibroblast
HJ:	Hormone Juvénile
IAPV:	Israelite Acute Paralysis Virus
IFITs:	Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats
IFNAR	Interferon-alpha/beta receptor
INF:	Interferon
LPS:	Lipopolysaccharide
NIAID:	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
OE:	Oléate d’Ethyle
PAMPs:	Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PEPS:	Projets Exploratifs Premier Soutien
PGRP:	Peptidoglycan-Recognition Protein
PO:	Phénol Oxydase
PRR:	Pattern Recognition Receptors
PTP:	Polar Tube Proteins
ROP16:	Rhoptry Protein 16
RT-qPCR:	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

SEC-PCP-SILAC:	Size Exclusion Chromatography-Protein Correlation Profiling-Stable Isotope Labeling by Amino Acids in cell Culture
SIDA:	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SILAC:	Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell culture
SOD2:	Super Oxyde Dismutase 2
SST3:	Système de Sécrétion de Type III
TLR:	Toll Like Receptor
TNF- :	Tumor Necrosis Factor
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling
VDAC:	Voltage Dependant Anion-selective Channel
Vg:	Vitellogénine
HIV:	Virus d'immunodéficience acquise
VSG:	Variant Surface Glycoprotein

CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE

Le choix du mode de vie parasitaire a été fait par plus de la moitié des espèces vivantes sur terre, et celles-ci jouent des rôles fondamentaux dans la régulation des équilibres écologiques (Lafferty et al., 2006; Schmid-Hempel, 2011). Afin de pouvoir atteindre leur niche écologique, celles-ci ont dû franchir plusieurs barrières chez l'hôte correspondant. Ainsi, il leur faut d'abord réussir à rencontrer leur hôte puis être capable de survivre à ses systèmes de défenses (Combes, 2005). Les interactions hôte-parasite existantes sont ainsi le fruit d'une longue coévolution entre le parasite et l'hôte au cours de laquelle des gènes ont été sélectionnés chez chacun des deux acteurs afin de respectivement contourner ou renforcer ces barrières donnant naissance à un véritable dialogue moléculaire. Le parasitisme intracellulaire étant le degré le plus poussé de ces associations et également celui présentant le plus de barrières à franchir, ces parasites ont dû développer les stratégies les plus sophistiquées afin de pouvoir se développer au sein de leur hôte. Chez ces parasites intracellulaires, les microsporidies, qui sont des parasites eucaryotes obligatoires apparentés aux champignons, sont considérées comme des parasites extrêmes, dépendant de leur hôte pour leur multiplication. Ces dernières présentent des génomes de faible taille et très compacts pour des organismes eucaryotes (2,9 MB à 51,3Mb) (Keeling et al., 2014). Les gènes codants pour plusieurs voies métaboliques ont disparu, certaines espèces ayant même perdu leur capacité à digérer les sucres. L'extrême dépendance vis à vis de leur hôte ainsi que le très faible nombre de gènes qu'elles possèdent en font ainsi des modèles de choix pour tenter de décrypter les stratégies minimales mises en place lors des interactions chez les parasites intracellulaires (Texier et al., 2010).

L'objectif de cette thèse a donc été de déchiffrer ce dialogue moléculaire qui s'établit entre une microsporidie et son hôte afin d'apporter de nouvelles données permettant d'éclairer les différentes stratégies mises en place lors des interactions hôte-parasite. Dans une démarche intégrative, nous avons choisi de travailler à deux niveaux. Le niveau cellulaire a été étudié au travers du suivi de la réponse protéique de cellules fibroblastiques humaines lors de l'infection par la microsporidie *Anncaliia algerae* à l'aide de la technique de protéomique quantitative SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino Acids in Cell culture). Cette étude nous a permis de suggérer un mécanisme original de détournement du système immunitaire de l'hôte à l'aide d'une protéine codée par un élément transposable. Ce travail a également permis d'identifier un certain nombre de protéines de la microsporidie dont certaines présentant des signaux de sécrétion, et qui peuvent constituer de potentiels effecteurs de pathogénie. Le niveau tissulaire a été étudié au

travers de la réponse de l'intestin de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) à l'infection par la microsporidie *Nosema ceranae* à l'aide de la technique de protéomique quantitative 2D-DIGE. Cette étude nous a révélé une perturbation de l'homéostasie intestinale suite à l'infection, avec l'induction d'un stress oxydant, une perturbation du développement de l'épithélium intestinal et un stress énergétique. Ces données, confortées par les précédentes études menées sur le sujet, nous ont amené à faire l'hypothèse d'un impact de l'infection sur le renouvellement de l'épithélium intestinal de l'abeille. Le stress physiologique engendré par l'infection perturberait suffisamment l'homéostasie de ce tissu entraînant un renouvellement insuffisant de l'épithélium pour compenser les pertes liées à l'infection. Cette hypothèse a pu être vérifiée lors de la dernière étude menée, au cours de laquelle j'ai suivi le taux de multiplication des cellules souches intestinales d'abeilles au cours d'une cinétique d'infection par *N. ceranae*. Nous avons ainsi montré que l'infection avait un impact négatif sur le taux de renouvellement, et ce dès le premier jour de l'infection. Le suivi en PCR quantitative de gènes impliqués dans les voies de signalisation a révélé une perturbation de ces voies qui pourrait expliquer la baisse du renouvellement cellulaire intestinal. Cependant la présence de signaux contradictoires complique la compréhension des mécanismes sous-jacents et de nouvelles expérimentations seront nécessaires afin de décrypter ce phénomène. L'ensemble des travaux ci-dessus a fait l'objet des communications suivantes:

Publications

† : Co-auteur

- Chetouhi, C., Panek, J.†, Bonhomme, L., ElAlaoui, H., Texier, C., Langin, T., de Bekker, C., Urbach, S., Demettré, E., Missé, D., Holzmüller, P., Hughes, D.P., Zanzoni, A., Brun, C., Biron, D.G., 2015. Cross-talk in host–parasite associations: What do past and recent proteomics approaches tell us? *Infect. Genet. Evol.* 33, 84–94.
- Panek, J., El Alaoui, H., Mone, A., Urbach, S., Demettré, E., Texier, C., Brun, C., Zanzoni, A., Peyretailade, E., Parisot, N., Lerat, E., Peyret, P., Delbac, F., Biron, D.G., 2014. Hijacking of host cellular functions by an intracellular parasite, the microsporidian *Anncaliia algerae*. *PLoS One* 9, e100791.
- Vidau, C., Panek, J. †, Texier, C., Biron, D.G., Belzunces, L.P., Le Gall, M., Broussard, C.C., Delbac, F.F., El Alaoui, H., 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J. Invertebr. Pathol.* 121, 89–96.

En préparation:

Panek, J., Roriz, D., Blot, N., Frederic, D., Biron, D.G., Hicham, E.A., 2016. Infection by *Nosema ceranae* cause perturbations of the gut epithelium renewal homeostasis of the honey bee, *Apis mellifera*. en préparation.

Annexes

Parisot, N., Pelin, a., Gasc, C., Polonais, V., Belkorchia, a., Panek, J., El Alaoui, H., Biron, D.G., Brasset, E., Vaury, C., Peyret, P., Corradi, N., Peyretailade, E., Lerat, E., 2014. Microsporidian Genomes Harbor a Diverse Array of Transposable Elements that Demonstrate an Ancestry of Horizontal Exchange with Metazoans. *Genome Biol. Evol.* 6, 2289–2300.

CHAPITRE II: BIBLIOGRAPHIE

1. Les interactions hôte-parasite

La vie serait apparue il y a 3,5 milliards d'années dans les océans et tout en évoluant du stade unicellulaire au stade pluricellulaire, elle a réussi à conquérir tous les milieux, y compris le vivant lui-même, donnant ainsi naissance, entre autre, au parasitisme. Certains auteurs considèrent en effet que plus de la moitié des organismes vivants sur terre possède un mode de vie parasitaire (Lafferty et al., 2006; Schmid-Hempel, 2011).

1.1. Le mode de vie parasitaire

L'ensemble des espèces vivantes sont en interaction constante avec leur environnement qui comprend l'ensemble des facteurs abiotiques, mais également les autres espèces présentes. Ces interactions biotiques peuvent être classées en fonction de leurs conséquences sur les organismes considérés (Combes, 2005). Ainsi on peut distinguer les interactions avec des effets négatifs réciproques (compétition), un effet bénéfique pour l'un et négatif pour l'autre (prédation, parasitisme), des interactions présentant des effets bénéfiques réciproques (mutualisme) et enfin des interactions ayant un effet bénéfique pour l'un des acteurs sans effet négatif pour le second (commensalisme, phorésie) (Mitchell et al., 2006). Ces interactions peuvent également être classées selon leur caractère durable ou transitoire. C'est sur ce critère que se distingueront les interactions symbiotiques dont fait partie le parasitisme. En effet, la prédation comme le parasitisme sont des interactions qui se font au détriment d'un des partenaires, mais elles se différencient par leur durée. Dans le cas du parasitisme, la rencontre n'est que le point de départ de cette relation dans laquelle l'hôte et le parasite vivront en interaction, l'hôte servant d'habitat au parasite (Combes, 2005).

*Ainsi, le parasitisme est vu comme **une relation durable et obligatoire à au moins un stade de sa vie, au cours de laquelle le parasite utilise l'hôte comme son habitat lui permettant de s'abriter, de trouver les nutriments nécessaires à sa survie et à sa reproduction tout en ayant généralement un impact négatif sur la fitness de celui-ci** (Combes, 2005).*

Cette définition du parasitisme permet de s'affranchir de l'ancienne dénomination qui est encore utilisée dans le milieu médical selon laquelle un parasite est un organisme eucaryote (protozoaire ou métazoaire) qui se nourrit de son hôte. Elle permet également d'englober un

certain nombre d'entités qui n'étaient pas auparavant considérées comme des parasites (virus, bactéries et éléments transposables). Je ferai donc référence à la 1^{ère} définition lorsque je parlerai des parasites dans la suite du manuscrit.

1.2. Les différents types de parasitismes

Bien que l'aspect négatif du parasite sur son hôte soit un critère retenu pour différencier le parasitisme de la symbiose mutualiste, la frontière entre ces deux types d'interactions est en réalité relativement faible. Il existe plutôt un gradient continu de situations pour lesquelles les bénéfices sont plus ou moins partagés entre l'hôte et le symbiote : du pur parasitisme, où l'hôte n'est qu'exploité par le parasite, aux symbioses mutualistes dans lesquelles chacun des deux partenaires tire des bénéfices de cette association (Combes, 2005). Une distinction est faite entre les **microparasites** (virus, bactéries, protistes) et les **macroparasites** (métazoaire, helminthe, arthropodes...).

Une seconde distinction peut être faite au niveau de la localisation du parasite par rapport à l'hôte. Nous distinguons ainsi :

- **les ectoparasites** qui vont rester à la surface de l'hôte,
- **les endoparasites** qui seront internalisés et qui vivront à l'intérieur de l'organisme hôte voire même à l'intérieur d'une cellule de leur hôte, et pour lesquels nous parlerons de parasites intracellulaires,

Enfin une dernière distinction est faite en fonction du niveau de dépendance à l'hôte, on distingue ainsi :

- **les parasites obligatoires** qui nécessitent un hôte pour accomplir tout ou partie de leur développements,
- **les parasites facultatifs** qui peuvent effectuer leur cycle de façon libre ou parasitaire.

Si cette classification est régulièrement utilisée pour des raisons pratiques, elle ne reflète pas tous les aspects de la réalité où les intermédiaires entre ces différentes situations sont possibles et représentent des niveaux d'adaptation plus ou moins poussés au mode de vie parasitaire. Combes (2005) présente ainsi l'exemple de différentes espèces de mollusques prosobranches dont certaines sont des macroparasites plus ou moins spécialisés : de l'ectoparasite

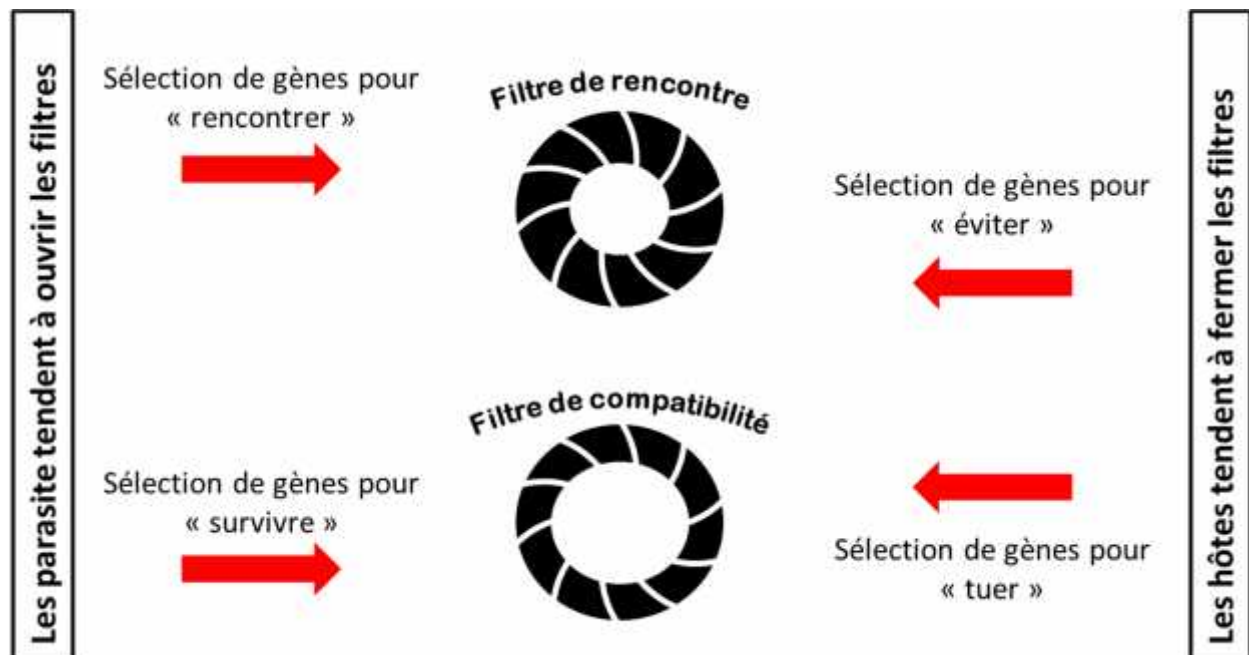


Figure 1: Les filtres d'associations hôtes-parasites:

La rencontre et la compatibilité dans les associations hôte-parasite peuvent être symbolisées par des diaphragmes. Le parasite présente dans son génome des gènes lui permettant d'ouvrir ces deux filtres tandis que l'hôte possède des gènes lui permettant de les fermer. Ces filtres étant influencés à la fois par l'hôte et le parasite sont donc des phénotypes dit « croisés » (d'après Combes, 2006).

opportuniste à l'endoparasite obligatoire. Il décrit des espèces de plus en plus intimement liées à leurs hôtes, et propose un passage au mode de vie parasitaire en trois étapes :

- Lors de la première étape qui marque l'entrée dans le mode vie parasitaire, le parasite accroché sur le tégument de son hôte va passer du détournement d'une partie de la nourriture de son hôte à un prélèvement direct de nourriture à partir de l'hôte.
- Dans la deuxième étape, le parasite va percer le tégument et s'enfoncer plus ou moins profondément dans la cavité générale de son hôte ne laissant qu'un mince siphon de communication avec l'extérieur. Certains parasites comme les *Thyonicola* vont perdre leur tube digestif pour se nourrir directement par osmotrophie.
- Enfin, le parasite va perdre tout contact avec l'extérieur et devenir un véritable endoparasite. Le parasite évolue librement dans la cavité générale, se nourrit par osmotrophie, et n'a plus aucun contact avec l'extérieur.

Ce processus d'adaptation vers un endoparasitisme s'accompagne en général d'une simplification morphologique et fonctionnelle comme par exemple la disparition du tube digestif dans l'exemple cité ci-dessus ou la disparition de certains organes senseurs ou locomoteurs devenus inutiles. Le passage au mode de vie parasitaire va donc s'accompagner d'une adaptation assez profonde de la physiologie et de la morphologie tendant vers une hyperspécialisation.

1.3.L'évolution du mode de vie parasitaire

1.3.1. La coévolution

L'établissement d'une relation hôte-parasite peut se décomposer en deux étapes qui doivent être accomplies pour que le parasite puisse se développer et qui peuvent être résumées à deux filtres appelés **filtre de rencontre** et **filtre de compatibilité** (Figure 1). Ainsi pour assurer sa reproduction, le parasite va tenter de maintenir ces deux filtres les plus ouverts possibles tandis que l'hôte fera tout son possible pour les refermer. Au cours de cette interaction, des adaptations permettant d'ouvrir ou de fermer ces filtres vont être sélectionnées par l'hôte et le parasite, ouvrant ainsi la voie à une course aux armements dont le principe est bien décrit par **l'hypothèse de la reine rouge** proposée par Leigh Van Valen et tirée d'un passage du roman de Lewis Carroll : *Alice au pays des merveilles*.

Van Valen a suggéré que le moteur principal de l'évolution résidait dans les interactions biotiques. Ainsi, lorsque deux espèces sont en compétition, à chaque fois que l'une d'elles acquiert un avantage spécifique, cet avantage va modifier l'environnement de l'autre et ainsi l'obliger à sélectionner à son tour un avantage compensateur. Aucun des partenaires n'arrivant à prendre l'avantage sur l'autre, la situation paraît donc figée d'un point de vue extérieur, alors que les deux acteurs sont en perpétuelle évolution. Van Valen a comparé cette situation à un passage d'Alice au pays des merveilles dans lequel Alice courant sur un chemin avec la reine rouge, fait remarquer que le paysage qui les entoure ne change pas ce à quoi la reine répond : « Il faut courir aussi vite que possible pour rester au même endroit ».

Ainsi la mise en place d'une interaction hôte-parasite va être à l'origine d'une évolution des génomes et de leur expression au sein des deux organismes considérés. Dans ce cadre, le parasite va sélectionner des gènes qui lui permettront d'ouvrir ces filtres et donc :

- de rencontrer son hôte,
- de survivre dans l'hôte (lutte contre les défenses immunitaires de l'hôte),
- dans certains cas de modifier l'hôte afin de créer des conditions favorables à son développement.

Dans ce dernier cas, Richard Dawkins (1982) a proposé le concept de phénotype étendu, une situation dans laquelle le phénotype de l'hôte va être modifié par le génome du parasite. C'est par exemple le cas lors de l'infection de la fourmi *Leptothorax acervorum* par le cestode parasite *Choanotaenia unicoronata*. Le parasite va provoquer un changement de couleur chez son hôte qui va devenir doré le rendant plus visible pour les oiseaux en particulier pour *Dendrocopos major* qui est l'hôte définitif du parasite (Heinze et al., 1998).

A l'opposé, l'hôte va sélectionner des gènes lui permettant :

- d'éviter de rencontrer le parasite,
- d'éliminer le parasite une fois celui-ci installé.

1.3.2. Le filtre de rencontre

La première étape est la rencontre, le parasite doit se trouver au contact de son hôte afin de pouvoir s'y fixer puis s'y développer. Des organes sensoriels permettent ainsi aux macroparasites de détecter la présence de l'hôte par le biais d'informations sensibles (visuelles, olfactives, chimiques). Les tiques en sont un bon exemple, elles possèdent en effet tout un arsenal de détecteurs sensibles à une grande diversité de stimuli (CO₂, hormones, hygrométrie, température, vibrations) leur permettant de repérer leurs cibles (Steullet and Guerin, 1994). Dans un certain nombre de cas, les parasites ont également adapté leur comportement afin de se mettre en quête de l'hôte au bon endroit et à la bonne période, et ainsi de maximiser les chances de rencontre. Ainsi, les tiques, après chaque métamorphose, vont aller en quête d'un nouvel hôte pendant la journée au sommet de la végétation. Certains parasites tels que les Schistosomes, qui sont des trématodes réalisant un cycle à deux hôtes, sont capables d'émerger de leur hôte primaire à une heure particulière de la journée en fonction de leur hôte final. Ainsi *Schistosoma bovi* émergera en début de journée à l'heure où son hôte définitif (ongulé) a le plus de chance de venir s'abreuver alors que *S. rodhaini* (qui cible les rongeurs) émerge lui en début de nuit (Theron et Combes, 1995).

Chez les microparasites, en raison de la différence d'échelle et du manque de mobilité, la rencontre est avant tout le fruit du hasard. Pour compenser cette faiblesse, l'évolution a sélectionné des formes de résistance (spores, kystes...) leur permettant de survivre dans le milieu extérieur en attendant d'être de nouveau au contact d'un hôte. De plus, ces formes sont généralement produites en très grande quantité ce qui leur permet de maximiser leurs chances de rencontre avec l'hôte et donc d'assurer leur descendance. Certains microparasites s'appuient également sur un premier hôte qui va se charger de la rencontre avec l'hôte suivant, comme c'est le cas pour les différentes espèces de *Plasmodium* qui sont transmises à l'homme par leur hôte définitif, un moustique (Greenwood et al., 2008).

Du côté de l'hôte, cette première ligne de défense n'est pas la plus efficace. Même si certaines espèces ont sélectionné des comportements leur permettant d'éviter la rencontre avec le parasite, cela reste généralement minoritaire. En effet, contrairement à l'évitement d'une rencontre avec un prédateur, un stade infectieux de parasite est beaucoup plus difficile à repérer en particulier en raison de sa taille qui est toujours inférieure à celle de l'hôte. Ainsi, l'hôte

dépensera en général plus d'énergie pour influencer la compatibilité, stratégie avec laquelle il aura plus de succès. Ceci est vrai par exemple pour les microparasites que l'hôte va tenter d'éliminer à l'aide de son système immunitaire. Les microsporidies étant des microparasites, je me concentrerai pour la suite de ce chapitre sur les endo-microparasites.

1.3.3. Le filtre de compatibilité

Une fois l'interaction débutée, des échanges d'informations vont se mettre en place entre l'hôte et le microparasite. Il s'agira pour l'hôte de tenter d'éliminer le plus rapidement possible le parasite en particulier à l'aide son système immunitaire, et pour le parasite de tenter d'échapper au système immunitaire tout en modifiant son environnement (l'hôte) afin de se créer des conditions favorables. Cet échange d'informations qui se fait par l'échange de molécules entre les deux acteurs constitue un véritable dialogue moléculaire.

Les microparasites ont développé tout un ensemble de moyens leur permettant d'éviter la réponse immunitaire de l'hôte. Bien que la majorité des eucaryotes parasites soient intracellulaires, ce mode de vie est relativement rare chez les bactéries. Ceci peut certainement s'expliquer par les différentes difficultés auxquelles sont confrontées ces parasites (Sibley, 2011). En effet, un parasite intracellulaire va ainsi avoir à passer plusieurs étapes critiques. Il va devoir être capable de reconnaître et d'entrer dans sa cellule cible. Il doit ensuite échapper aux nombreux systèmes de défense dont l'induction de l'apoptose des cellules infectées (Kennedy and DeLeo, 2009), l'autophagie, la synthèse d'espèces oxygénées réactives (EROs) et la dégradation lysosomale (Nathan and Shiloh, 2000). Celui-ci devra également échapper à la surveillance par les systèmes de reconnaissance existant dans la cellule parmi lesquels on retrouve les récepteurs TLR (Toll Like Receptor) (Kawasaki and Kawai, 2014). Enfin, le parasite devra être capable de trouver des nutriments dans le milieu intracellulaire qui ne contient pas nécessairement tous les nutriments dont il a besoin. Pour cela, le parasite devra moduler son environnement (la cellule hôte) et créer ainsi une niche écologique favorable à son développement. Les différentes stratégies d'échappement au système immunitaire de l'hôte peuvent être séparées entre les stratégies actives où le parasite va interférer de façon active avec le système immunitaire de l'hôte, et les stratégies passives où le parasite va jouer sur sa propre physiologie pour échapper à celui-ci.

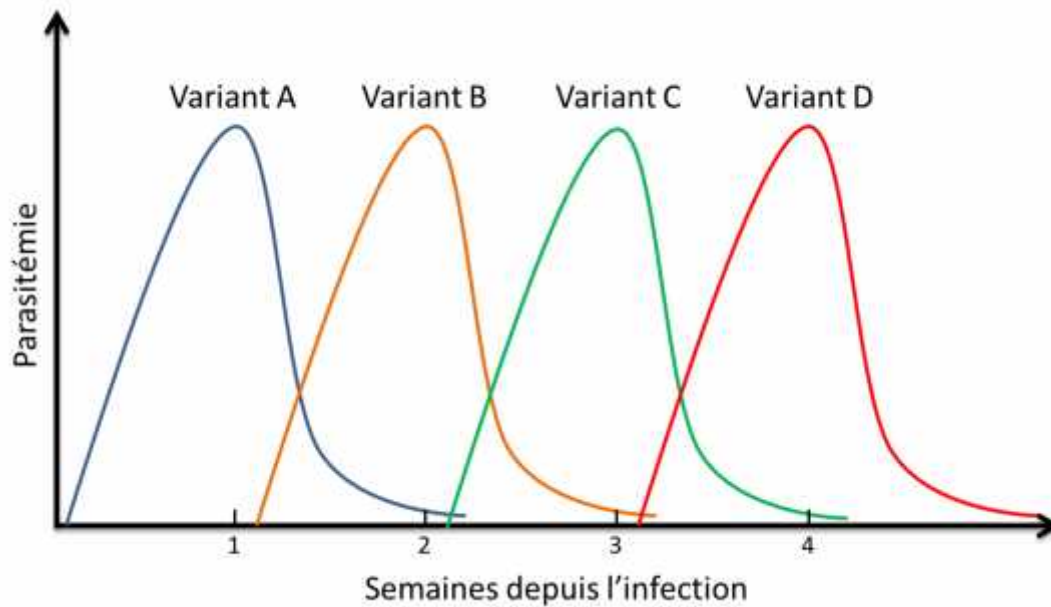


Figure 2: Diagramme schématique illustrant la variation antigénique chez le parasite *Trypanosoma brucei*:

Lorsqu'un hôte mammifère est infecté par *T. brucei*, le système immunitaire de l'hôte produit des anticorps contre l'antigène majeur de surface appelé VSG (Variant Surface Glycoprotein) qui forme un manteau autour du parasite. Cependant, avant que tous les parasites ne soient éliminés, de nouveaux parasites exprimant un nouveau variant de la protéine VSG à leur surface vont émerger et ne seront pas reconnus par la réponse immunitaire initiale. Ce nouveau variant (B) va progressivement remplacer le variant (A) jusqu'à ce qu'il devienne à son tour majoritaire et que des anticorps soient produits contre celui-ci. Un nouveau variant (C) émergera et deviendra à son tour majoritaire. Ces vagues successives de variants VSG vont permettre au parasite de ne jamais laisser le temps à l'hôte de développer une immunité efficace.

1.3.3.1. Stratégies d'échappement passif au système immunitaire

Le camouflage est une technique passive d'échappement au système immunitaire qui est très efficace et qui peut se révéler peu coûteuse à mettre en œuvre. Certains parasites se cachent donc ainsi du système immunitaire en infectant des tissus non couverts par le système immunitaire de l'hôte (Schmid-Hempel, 2009). C'est par exemple le cas du globe oculaire dans lequel la présence de cytokines immunosuppressives semble permettre le développement de *Toxoplasma gondii* (Bhopale, 2003). Il est également possible d'empêcher l'hôte d'acquérir une immunité en changeant régulièrement de molécules de surface, c'est ce qu'on appelle la variation antigénique. Le cas le plus documenté est certainement celui de *Trypanosoma brucei*, l'agent de la maladie du sommeil, qui possède un mécanisme de variation antigénique très évolué (Stockdale et al., 2008). *T. brucei* exprime ainsi massivement à sa surface des protéines appelées VSG (Variant Surface Glycoprotein). Cette protéine qui est exprimée à plus de 10 millions de copies identiques va donc être prioritairement ciblée par le système immunitaire de l'hôte qui va rapidement développer une immunité à long terme (Lymphocytes B). Afin d'échapper à cette réponse, le parasite présente régulièrement un changement de variant VSG au cours de l'infection. Ainsi, régulièrement un nouveau variant de VSG émergera et permettra au parasite d'échapper à l'immunité de l'hôte (Figure 2). Le génome de *T. brucei* possédant plus de 1500 gènes codant pour des variants de VSG, nous comprenons dès lors qu'il sera presque impossible pour l'hôte de développer une réponse immunitaire sur le long terme (Stockdale et al., 2008). Ce type de variation antigénique est très largement observé chez d'autres espèces de parasites, comme *Plasmodium* (protéines Var), chez certaines bactéries, ou encore chez les virus où elle découle de mutations régulières. Ainsi dans le cas du VIH (Virus d'immunodéficience acquise), l'émergence de nouveaux variants par mutations aléatoires permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Davenport et al., 2008).

1.3.3.2. Stratégies d'échappement actif au système immunitaire

En parallèle de ces stratégies passives d'échappement, les parasites ont également développé tout un ensemble de mécanismes actifs afin de moduler à leur avantage la réponse immunitaire de leur hôte. Ces stratégies passent par la sécrétion de molécules appelées effecteurs de virulence. Ces effecteurs vont être capables de bloquer ou de moduler de façon spécifique certaines étapes de la réponse immunitaire (Schmid-Hempel, 2011). Pour les virus, ces molécules seront directement exprimées dans l'hôte. Chez les bactéries et les parasites eucaryotes, ce

système peut être médié par les systèmes de sécrétion (comme le système de type 3 (SST3) chez les bactéries). Ainsi, certains virus, comme le cytomégalo virus (CMV), produisent des protéines appelées immunoévasins, capables de se fixer au complexe majeur d'histocompatibilité 1, empêchant sa translocation vers la membrane et donc bloquant la présentation des antigènes au système immunitaire (Lu in et al., 2014). Ces molécules vont aller interférer directement avec les différents réseaux de régulation de l'hôte afin de moduler plusieurs fonctions essentielles au développement du parasite. Par exemple, la protéine ROP16 (rhoptry protein 16) de *Toxoplasma gondii*, sécrétée directement dans le cytoplasme de l'hôte, est par la suite prise en charge par le système de transport de la cellule et sera adressée au noyau de celle-ci. Cela est rendu possible par la présence d'un signal d'adressage nucléaire présent dans la séquence de la protéine. ROP16 va phosphoryler directement STAT3 et STAT6 perturbant ainsi fortement la réponse immunitaire innée (English et al., 2015). Un autre composant essentiel de la réponse immunitaire rapide est l'activation du complément. Le complément fait partie de la réponse innée, il est composé de protéines présentes dans le sérum et dans les membranes cellulaires qui, en interagissant, vont former des pores au niveau de la membrane des pathogènes, perturbant leur perméabilité et provoquant ainsi leur lyse. Afin d'inactiver cette réponse, les différentes espèces de *Leshmania* semblent ainsi capables, en fonction de la longueur de leur lipophosphoglycane, de bloquer la cascade enzymatique à l'origine de l'activation du complément (Olivier et al., 2005).

Chez les vertébrés, la réponse immunitaire fait également intervenir un certain nombre de cellules immunocompétentes telles que les macrophages : ces derniers peuvent être ciblés par les parasites qui ont développé des stratégies pour échapper à la phagocytose. *Shigella* provoque par exemple directement la mort des macrophages en injectant, à l'aide du système de sécrétion SST3, l'invasine ipaB qui semble nécessaire et suffisante pour déclencher son apoptose (Thirumalai et al., 1997). Une seconde stratégie pour échapper à la réponse cellulaire consiste à perturber la synthèse des différentes cytokines et interférons qui sont nécessaires à la coordination de la réponse de l'hôte. *Yersinia pestis*, l'agent de la peste, est ainsi capable de faire baisser l'expression du facteur de nécrose tumorale- (TNF-) à l'aide de la protéine YopJ et donc de bloquer l'inflammation et le recrutement d'autres cellules immunitaires (Palmer et al., 1998). Enfin pour finir, une réponse efficace pour l'hôte afin de limiter la multiplication des parasites intracellulaires, est de provoquer l'apoptose des cellules infectées. Certains pathogènes sont capables de bloquer cette activation. Cela a été surtout montré chez les virus tel celui de

l'hépatite B (Liu et al., 2012), mais a déjà été suggéré chez des parasites eucaryotes comme les microsporidies *A. algerae* (Scanlon et al., 2000), ou *Encephalitozoon cuniculi*, qui semble capables d'inactiver la translocation de la protéine p53 dans le noyau, bloquant de ce fait l'apoptose (del Aguila et al., 2006). Cependant les mécanismes moléculaires sous-jacents chez les microsporidies ne sont pas décrits.

Les parasites intracellulaires sont donc le produit d'une longue coévolution entre deux organismes qui ont cohabité de plus en plus intimement au cours du temps. De par cette évolution partagée, ils ont dû acquérir une grande variété de stratégies leur permettant d'envahir la cellule hôte, de survivre en se cachant du système immunitaire ou en le perturbant et en détournant de plus en plus efficacement les ressources de leurs hôtes. Parmi eux, les parasites intracellulaires obligatoires présentent, de par leur mode de vie, la spécialisation la plus poussée, et donc les stratégies les plus évoluées. Les microsporidies, avec leur génome très réduit, et leur extrême dépendance vis-à-vis de leur hôte sont certainement les parasites eucaryotes intracellulaires qui ont poussé le plus loin leur adaptation au mode de vie intracellulaire et sont donc des modèles de choix pour étudier le dialogue moléculaire se mettant en place lors de l'interaction.

2. Les microsporidies: un modèle d'interaction minimale hôte-parasite

2.1. 150 ans de recherche sur les microsporidies

Les microsporidies sont étudiées depuis plus de 150 ans. Le rapport de Carl Wilhelm Von Nägeli, publié le 30 octobre 1857, est considéré comme le point départ de l'étude de ces parasites. Dans ce rapport Nägeli traite du travail de Pasteur sur la pébrine, et utilisera pour la première fois le terme microsporidie (Nägeli, 1857). La pébrine, apparue au cours du 19^{ème} siècle, est une maladie causée par la microsporidie *Nosema bombycis* qui ravagea l'industrie de la soie, réduisant presque à néant la production en France et en Italie. Dès 1845, Louis Pasteur commença à étudier cette maladie et, en 1865, il fut officiellement nommé à la tête d'une commission d'enquête du ministère de l'agriculture chargée d'étudier ce problème. C'est à cette occasion qu'il démontre que cette maladie est causée par une microsporidie, qui fut plus tard appelée *Nosema bombycis* (Balbiani, 1882), faisant d'elle la première espèce décrite. Auparavant, quelques travaux avaient déjà fait état de l'observation de celles-ci, en particulier Gluge en 1938 qui avait décrit un parasite de poisson, plus tard identifié comme étant *Glugea anomala* (Gluge,

1838). Cependant le rapport de Nägeli reste considéré à l'heure actuelle comme l'acte fondateur de l'étude des microsporidies.

Par la suite, de nombreuses autres espèces microsporidiennes ont été découvertes chez différents groupes d'animaux, en particulier chez les poissons et les invertébrés, conduisant à la publication de la première revue sur le sujet en 1899 par Alphonse Labbé (Labbé, 1899). C'est également à cette époque que Zander décrit *Nosema apis*, la première espèce de microsporidie découverte chez l'abeille domestique *A. mellifera* (Zander, 1909). A l'heure actuelle, le nombre exact d'espèces de microsporidies est estimé à 1300, et sont réparties en 160 genres (Keeling, 2009). Toutes les microsporidies ont pour hôtes des animaux ou des protozoaires, et certaines, responsables de maladies humaines, ont été particulièrement observées chez des patients immunodéprimés, ce qui leur a d'ailleurs valu un regain d'intérêt important dans les années 1990 à l'occasion de la pandémie du SIDA (Curry and Canning, 1993; Lucas et al., 1989; Shadduck, 1989).

2.2.Caractères morphologiques

Les microsporidies sont des parasites intracellulaires obligatoires apparentées aux champignons, eucaryotes unicellulaires qui présentent des caractéristiques structurales et organisationnelles très spécifiques. Elles présentent de fortes différences entre leurs formes multiplicatives (végétatives) et leurs formes de dissémination (formes sporales). Le stade végétatif montre plusieurs caractères en apparence ancestraux. En effet, à la place des mitochondries classiques, des vestiges nommés mitosomes, sont observés (Goldberg et al., 2008), et leurs ribosomes semblent structurellement plus proches de ceux d'organismes procaryotiques. Il a également été noté une absence de peroxyosome (Vávra and Larsson, 2014). Enfin, la principale originalité des microsporidies tient dans l'appareil infectieux unique dans le règne animal : composé notamment d'une structure appelée tube ou filament polaire. Ce tube permet, lors de son extrusion, d'injecter le contenu de la spore dans la cellule hôte, permettant ainsi la multiplication du parasite. Cette forme sporale est la seule qui puisse survivre à l'extérieur de la cellule hôte, il s'agit de la forme de résistance ou de dissémination.

2.2.1. La spore

La spore est extrêmement résistante et peut supporter des conditions environnementales relativement sévères (dessiccation, température, contraintes physiques) sans perdre son potentiel

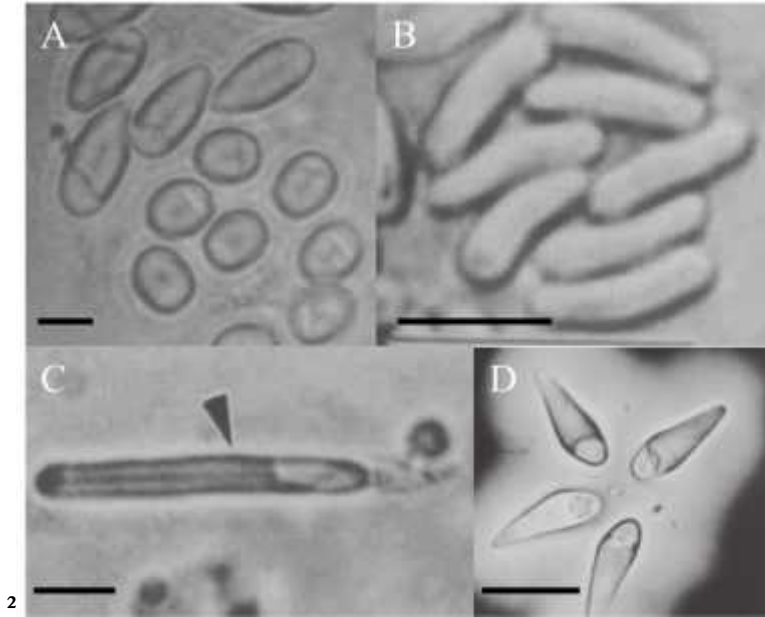


Figure 3: Diversité de formes des spores de microsporidies

(A) Spores ovoïdes et pyriformes d'*Amblyospora callosa* parasite d'un insecte aquatique appartenant à l'ordre des *Trychoptera* ; (B) Spores en forme de bâtonnets de *Resiomeria odonatae* parasite de libellules (C) Spore allongée de *Jirovecia involuta* parasite d'un ver aquatique (D) Tetraspore de *Marssoniella elegans* parasite d'un copépode. La barre d'échelle représente 5 µm (modifiée d'après Vávra et Ronny Larsson, 2014).

infectieux. Des spores de formes diverses sont observées selon l'espèce considérée (Figure 3), ou dans certains cas au sein d'une même espèce (Keeling and Fast, 2002) : ovoïde (*Enterocytozoon*, *Nosema*), pyriforme (*Marssoniella*), sphérique (*Pilospora*), ou encore en forme de bâtonnet (*Bacillidium*, *Helmichia*). Cependant, la forme ovoïde reste la plus observée. La plupart des espèces présentent des spores de quelques μm , mais l'écart entre les plus grandes et les plus petites est considérable, allant de 1 μm pour *Enterocytozoon bienewisi* à près de 40 μm de long pour *Bacillidium filiforme* (Vávra and Larsson, 2014). La paroi de la spore est construite de façon à pouvoir résister à la forte pression osmotique qui sera présente durant la germination et se compose de 2 couches extérieures à la membrane plasmique : l'exospore et l'endospore.

2.2.2. Ultrastructure de la spore

L'exospore est la couche la plus extérieure (Figure 4). Elle apparaît dense aux électrons en microscopie électronique à transmission et semble d'épaisseur uniforme tout autour de la spore. Son épaisseur et sa structure varient fortement suivant l'espèce, partant d'une fine couche dense non stratifiée d'environ 10 nm jusqu'à une structure plus complexe composée de multiples couches et d'environ 200 nm d'épaisseur (Vávra and Larsson, 2014).

L'endospore, contrairement à l'exospore, apparaît transparente aux électrons et semble donc dépourvue de structure en couches. Son épaisseur peut atteindre chez certaines espèces 100 nm, et elle est uniforme exceptée à l'apex de la spore (disque d'ancrage, capuchon polaire), où elle est plus fine. C'est à cet endroit qu'aura lieu l'extrusion du tube polaire lors de la germination. Des coupes en cryofracture d'endospores d'*Amblyospora* ont montré une structure granulo-fibrillaire (Vávra and Larsson, 2014). Cette couche semble être composée en majorité d' α -chitine, ce qui a permis l'utilisation de calcofluor (molécule fluorescente se fixant sur la chitine ou la cellulose) pour leur détection en fluorescence (Didier et al., 1995). L'endospore ne se forme qu'à la fin de la sporogonie, en s'épaississant jusqu'à ce que la spore soit complètement mature. Cette formation tardive est certainement due au fait que sa mise en place va sceller la spore, isolant donc totalement la microsporidie du cytoplasme de la cellule hôte, duquel dépend la microsporidie pour son approvisionnement en nutriments (Vávra and Larsson, 2014). La surface interne de l'endospore est directement au contact de la membrane plasmique qui délimite le sporoplasme. Cette membrane est souvent considérée comme faisant partie intégrante de la spore, car elle ne sera pas injectée avec le sporoplasme dans la cellule hôte. Elle restera en effet

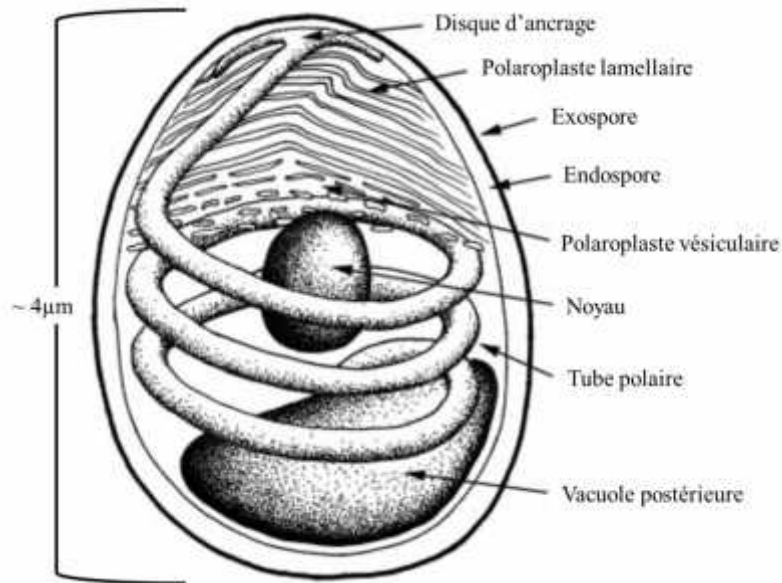


Figure 4: Schéma de l'ultrastructure d'une spore microsporidienne

Bien qu'il puisse y avoir une grande diversité de formes selon les espèces de microsporidies considérées, certaines structures sont présentes dans la plupart des espèces (modifiée d'après Keeling et Fast, 2002).

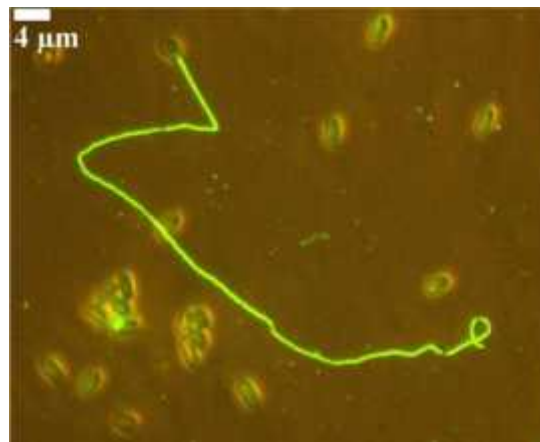


Figure 5: Marquage en immunofluorescence d'une protéine du tube polaire d'*Antonospora locustae*

Le tube polaire dévaginé d'*A. locustae* est ici marqué à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre une protéine de la famille PTP2 (AlPTP2b, *Antonospora locustae* Polar Tube Protein 2b) (modifiée d'après Polonais *et al.*, 2013).

dans la spore, et le sporoplasme acquerra une nouvelle membrane appelée polaroblaste (Vávra and Larsson, 2014).

La membrane plasmique possède une structure classique trilamellaire d'environ 7 nm d'épaisseur. Lors de la phase mérogonique, cette membrane semble montrer des signes d'interaction directe avec la cellule hôte sous la forme de vésicules ou de projections tubulaires augmentant sa surface (Vávra and Larsson, 2014). Peu avant le passage en sporogonie, du matériel dense aux électrons va venir se déposer sur cette membrane, et être à l'origine de la formation de la paroi sporale (Vávra, 1976).

La structure la plus caractéristique de la spore mature est le tube polaire, celui-ci est connecté à la partie antérieure de la spore et enroulé autour du sporoplasme (Vávra and Larsson, 2014). En présence d'une stimulation environnementale appropriée, le tube polaire sera très rapidement extrudé de la spore, puis, après avoir percé la membrane de la cellule hôte, servira de conduit pour permettre le passage du sporoplasme vers le cytoplasme de la cellule hôte. Chez la plupart des espèces de microsporidies, le tube polaire est bien plus long que la spore. En effet, chez la microsporidie *Nosema apis* infectant l'abeille domestique, le tube polaire peut atteindre une longueur de 300 μm pour une spore ne mesurant que 5 μm (Youssef and Hammond, 1971). Deux parties distinctes sont visibles : la partie strictement antérieure (appelée manubrium) qui fait usuellement un tiers de la longueur de la spore et une partie qui formera des spires autour du sporoplasme, touchant presque la paroi. Le diamètre de ce tube est variable et peut ne pas être constant sur toute la longueur, s'affinant parfois au pôle apical. Ce tube polaire se termine au niveau de la partie apicale par une structure en forme de cloche appelée disque d'ancrage. De par sa fonction unique dans le règne animal, de nombreux chercheurs se sont penchés sur sa structure et sa composition (Vávra and Larsson, 2014). À ce jour 5 protéines de tube polaire appelées PTP (Polar Tube Proteins) ont été identifiées (Figure 5) (Delbac et al., 1998a, 1998b; Polonais et al., 2013; Wang et al., 2007). Bien que la structure complète du tube ne soit pas encore élucidée, il semble que la protéine PTP1 soit le constituant majoritaire. De plus, celle-ci étant O-glycosylée (Taupin et al., 2007), elle serait potentiellement impliquée dans l'adhérence du tube polaire sur les récepteurs mannoses des cellules hôtes (Bouzahzah & Weiss 2010). Les séquences codantes pour les PTPs présentant peu de similarités entre les espèces ou avec d'autres protéines existantes, leur identification a été relativement difficile.

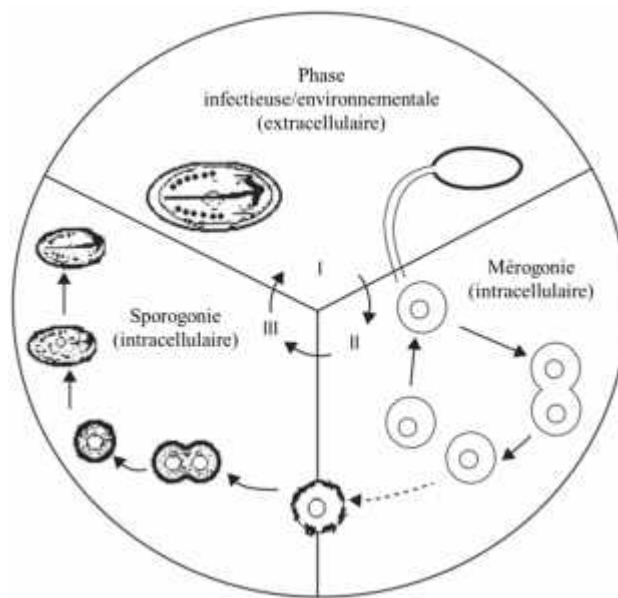


Figure 6: Cycle de vie des microsporidies :

Les 3 régions (I-III) représentent les 3 grandes phases des cycles de vie. La phase infectieuse ou environnementale (phase I) est la seule partie extracellulaire du cycle. Les spores infectieuses présentes dans l'environnement vont déclencher leur processus de germination en présence des conditions appropriées. Le tube polaire va être dévaginé et après avoir « percé » la membrane cytoplasmique de la cellule cible, il injectera le contenu de la spore (sporoplasme) entraînant le début de la phase II. Au cours de la mérogonie ou phase proliférative, les parasites vont se multiplier dans le cytoplasme de la cellule hôte. La phase III ou sporogonie aboutira à la formation des spores ; cette phase est caractérisée par la mise en place de la paroi et de l'appareil invasif (modifiée d'après Cali et Takvorian, 2014).

2.3.Cycle de vie

A ce jour, le cycle de vie des microsporidies n'est élucidé que pour quelques espèces. Cependant au vu des travaux existants, il apparaît que ces parasites possèdent des cycles de vie complexes : polymorphiques ou non et monoxène ou hétéroxène suivant l'espèce considérée. Ainsi il y a des espèces produisant un seul type de spores (*Nosema ceranae*, *Encephalitozoon cuniculi*...), et d'autres présentant des spores de formes, de tailles et de structures différentes, en fonction du stade de développement, du tissu, de l'hôte ou indifféremment de ceux-ci. La microsporidie *Spraguea lophii*, capable de parasiter le tissu nerveux de la lotte (*Lophius piscatorius*) chez qui elle provoque la formation de xénomes (fusions de plusieurs cellules en une seule cellule plurinucléée), possède ainsi deux types de spores de morphologies et de caryotypes différents en fonction de son stade de développement. Elle produit d'abord des spores haploïdes lors de la phase précédant la formation du xénome, puis des spores diploïdes sont produites à l'intérieur de celui-ci (Stentiford et al., 2013). Les microsporidies du genre *Amblyospora*, qui sont des parasites de moustiques réalisant leur cycle par le biais d'un hôte intermédiaire (un copépode) présentent également deux types de spores en fonction de l'organisme hôte. Des spores binucléées diploïdes infectantes sont produites dans les ovaires du moustique et permettent la transmission verticale du parasite. Les larves infectées résultantes produisent, dans leurs corps gras, des spores haploïdes mononucléées. Celles-ci ne sont pas infectantes pour le moustique, mais provoqueront sa mort permettant ainsi le passage vers leur hôte intermédiaire : le copépode (Andreadis, 1985).

En raison de la grande diversité d'espèces et de cycles de vie des microsporidies, il est relativement difficile de proposer un cycle de vie générique, d'autant plus que celui-ci n'est connu que pour un faible nombre d'espèces décrites. Cependant, trois grandes étapes sont communes chez toutes les espèces (Figure 6) (Cali and Takvorian, 2014) :

- la phase infectieuse ou environnementale.
- la mérogonie ou phase proliférative.
- la sporogonie ou phase de formation des spores.

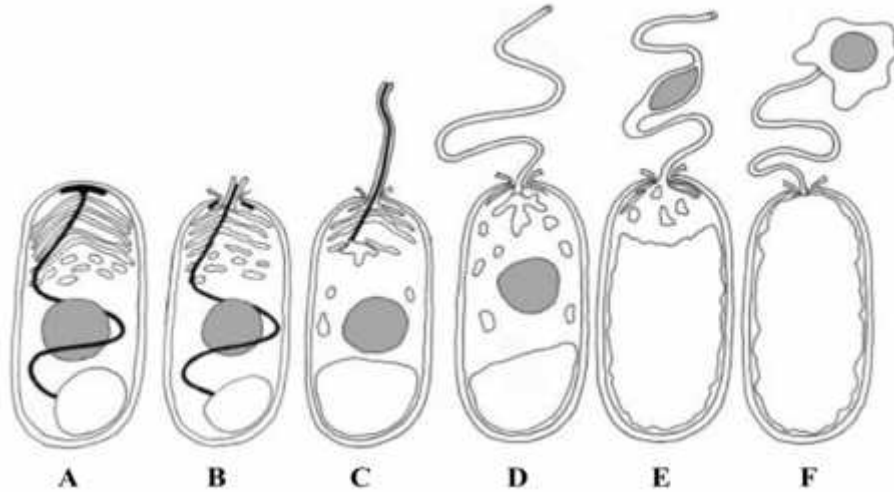


Figure 7: Schéma représentant les différentes étapes du processus de germination de la spore
 (A) Spore avant germination, le tube polaire est figuré en noir, le noyau en gris et la vacuole postérieure en blanc. (B) Dans les conditions appropriées (pH, concentrations en ions...), le processus de germination va s'enclencher. La pression osmotique va alors augmenter à l'intérieur de la spore, provoquant ainsi le gonflement du polaroplaste et de la vacuole. Ce phénomène va entraîner la rupture du disque d'ancrage au pôle antérieur de la spore, niveau auquel est ancré le tube polaire. (C) Début du processus de dévagination (ou d'extrusion) du tube polaire. (D) Spore après dévagination complète du tube polaire. (E) Le sporoplasme (comprenant le noyau) transite à travers le tube polaire. (F) Le sporoplasme qui émerge du tube polaire est entouré par une membrane provenant du polaroplaste lamellaire (modifié d'après P J Keeling et Fast, 2002).

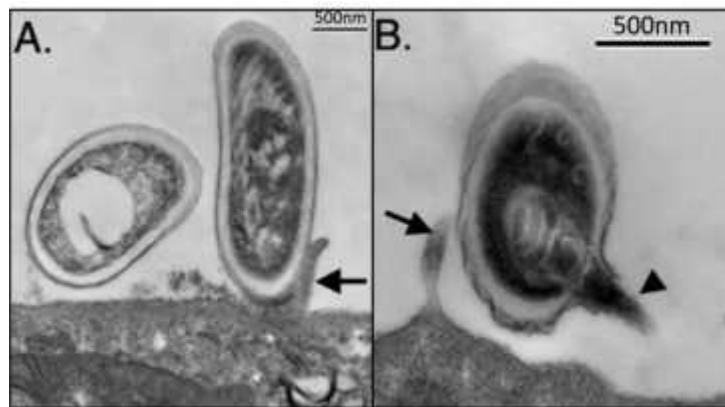


Figure 8: Attachement de spores d'*Encephalitozoon intestinalis* à la surface de cellules Caco-2
 Image en microscopie électronique à transmission de spores d'*E. intestinalis* attachées à la surface de cellules caco 2. Les spores semblent être en contact direct avec la surface de la cellule qui émet des pseudopodes (indiqués par la flèche). (A) L'extrusion du tube polaire n'a pas encore eu lieu. (B) Spore avec son tube polaire en cours de dévagination (indiqué par un triangle). Echelle : 500 nm. (modifiée d'après Hayman *et al.*, 2005).

De par leur statut de parasites intracellulaires obligatoires, seules les phases intracellulaires présenteront des étapes de multiplications.

2.3.1. La germination

Cette phase ne concerne que la forme sporale des microsporidies, qui est en effet la forme de dissémination. Les spores environnementales vont ainsi, en présence de conditions favorables, extruder leur tube polaire en dehors de la spore. Cette extrusion est extrêmement rapide, la vitesse étant évaluée à $105 \mu\text{m.s}^{-1}$ *in vitro* chez *A. algerae* (Frixione et al., 1992). Le mécanisme par lequel cette éversion du tube polaire est accomplie semble être commune à toutes les espèces (Undeen and Frixione, 1990) et paraît extrêmement complexe. Cependant nous avons aujourd'hui une idée générale de la façon dont se déroule ce phénomène.

Après ingestion de la spore par l'hôte, la germination va intervenir en présence d'un stimulus approprié. Le tube polaire va alors être éjecté de façon explosive, après rupture de la paroi sporale au niveau du capuchon polaire où celle-ci est la plus fine (Figure 7). L'éversion du tube polaire étant très violente, il est postulé que la force est suffisante pour que celui-ci puisse percer la membrane plasmique de la cellule hôte, et injecter le sporoplasme directement dans le cytoplasme de la cellule infectée (Cali and Takvorian, 2014). Il semblerait que l'adhésion des microsporidies à la cellule cible puisse être un élément initial nécessaire à l'éversion du tube polaire. Des observations en microscopie électronique indiquent en effet que l'attachement des spores d'*E. intestinalis* (figure 8), serait potentiellement dû à des glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs) présents à la surface de la cellule hôte (Hayman et al., 2005). Un second mécanisme d'invasion est décrit, il s'agit d'une entrée par phagocytose. De Graaf a ainsi observé des spores de *N. apis* phagocytées par des hémocytes d'abeilles (de Graaf et al., 1993). Ce mécanisme pouvant être bloqué par la cytochalasine D, il serait dépendant de l'actine (Takvorian et al., 2005). Dans ce cas de figure, les spores phagocytées utiliseraient leur tube polaire pour échapper à la fusion lysosomale. Le tube polaire serait donc un moyen d'échapper à la lyse après la phagocytose (Franzen, 2005).

Les conditions précises permettant l'activation du mécanisme de germination ont été largement étudiées, et de nombreux facteurs physiques (pression, dessiccation) (Olsen et al., 1986; Weidner, 1982) ou chimiques (pH, pression osmotique) (Weidner and Byrd, 1982) ont été testés avec plus ou moins de succès. Dans tous les cas la présence d'ions (Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} , Cl^{-}) et

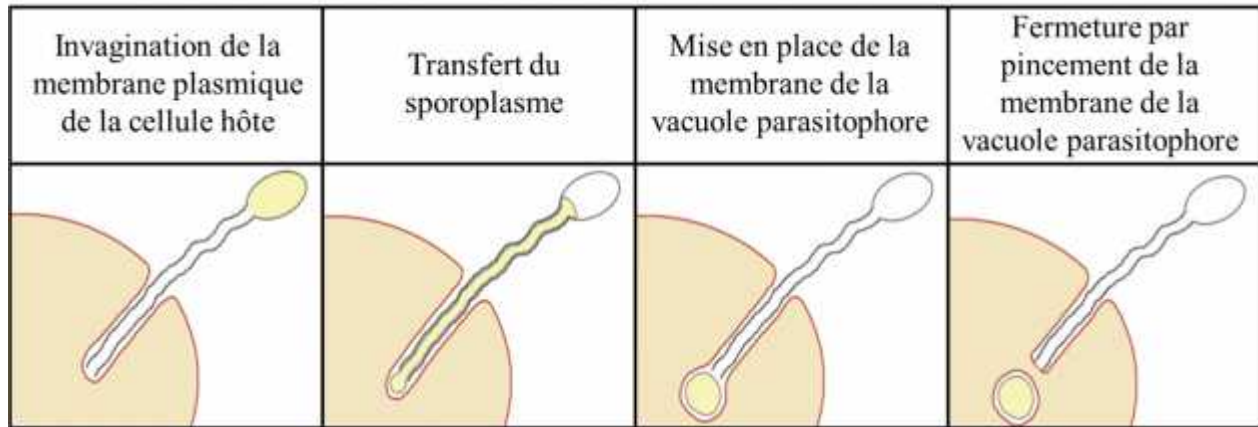


Figure 9: Mise en place de la vacuole parasitophore dans le cas d'*Encephalitozoon cuniculi*.

Contrairement au mode d'invasion classiquement observé chez les microsporidies, *E. cuniculi* ne percerait pas la membrane de la cellule hôte. La membrane plasmique serait repoussée vers l'intérieur du cytoplasme lors de l'extrusion du tube polaire, et serait à l'origine de la membrane de la vacuole parasitophore au sein de laquelle se multiplieront les parasites (modifiée d'après Bohne *et al.*, 2011).

des changements de pH semblent être nécessaires au déclenchement de ce mécanisme, certains ions étant en effet capables, en fonction des espèces, d'inhiber ou de déclencher la germination. Ainsi Frixione et al. (1994), ont montré que chez *A. algerae* le pourcentage de germination *in vitro* augmentait fortement en présence de cations monovalents (Na^+ , K^+) à un pH situé entre 8 et 10, alors que même une forte concentration de Cl^- en était incapable. Cependant malgré la diversité des stimuli possibles, ceux-ci résulteraient en un clivage du tréhalose contenu dans la spore en glucose, entraînant une rapide et forte augmentation de la pression osmotique. Cette augmentation provoquerait un afflux d'eau massif dans la vacuole postérieure conduisant à une augmentation rapide de la pression intra sporale, conduisant à la rupture de la paroi sporale au niveau du disque d'ancrage aboutissant à l'extrusion du tube polaire.

2.3.2. La mérogonie

Après l'injection du sporoplasme dans le cytoplasme de la cellule hôte, la phase de prolifération peut commencer. Au cours de la mérogonie le parasite va se multiplier, par fission binaire ou multiple suivant les espèces. Cette multiplication peut avoir lieu soit directement au contact du cytoplasme de la cellule hôte comme c'est le cas pour *N. ceranae* ou alors, plus souvent, au sein d'un compartiment appelé vacuole parasitophore comme cela a été observé chez *E. cuniculi* par exemple.

Il a été montré que ces vacuoles pouvaient avoir des origines différentes suivant l'espèce microsporidienne considérée, certaines ayant pour origine la membrane plasmique de l'hôte comme *E. cuniculi* (Rönnebaumer et al., 2008) et d'autres étant mises en place majoritairement par le parasite. Ainsi Bohne et collaborateurs (2011) proposent un modèle d'invagination pour *E. cuniculi*. Lors de la germination, le tube polaire ne percerait pas la membrane plasmique, mais repousserait celle-ci vers l'intérieur emprisonnant ainsi le sporoplasme dans une vacuole issue de la membrane plasmique de l'hôte (Figure 9). Celle-ci est donc dans ce cas, formée dès le début de l'infection contrairement au cas de *Baccharia vesicularum* où cette interface semble être d'origine parasitaire et se met en place après la phase de germination par la sécrétion de vésicules par celui-ci (Wittner et al., 1998). La membrane de la vacuole parasitophore va être l'interface entre le parasite et son hôte et jouera donc un rôle important dans l'échange entre ces deux partenaires. Ce rôle central dans l'interaction est appuyé par plusieurs études. Ainsi chez *E. cuniculi*, celle-ci est capable de laisser passer des molécules d'une taille de 3 à 10 kDa, permettant ainsi le passage

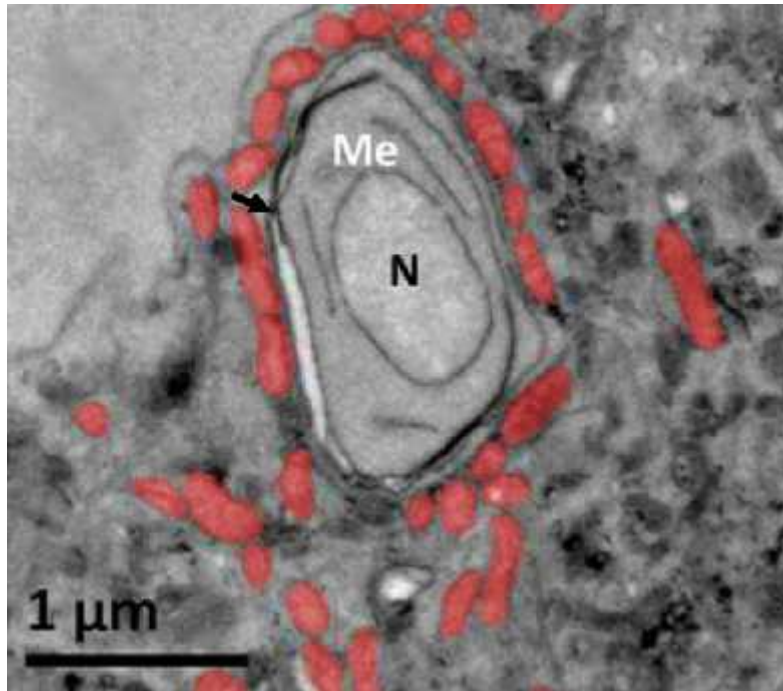


Figure 10: Recrutement des mitochondries de la cellule hôte autour de la vacuole parasitophore.

Photographie de microscopie électronique à transmission d'un stade méronte d'*E. cuniculi* dont la membrane de la vacuole parasitophore est recouverte de mitochondries de la cellule hôte qui sont ici colorées artificiellement en rouge. **Me** :méronte; **N** : noyau du méronte; **Flèche noire** : membrane de la vacuole parasitophore (modifiée d'après Hacker *et al.*, 2014).

de métabolites tels que l'ATP, certains sucres et acides aminés directement du cytosol de la cellule vers le lumen de la vacuole (Rönnebauer et al., 2008). Une étude plus récente a montré, chez ce même parasite, une plus forte relocalisation des mitochondries de l'hôte autour des membranes de la vacuole parasitophore, laissant supposer une interaction entre ces deux structures (Figure 10). De plus, lorsque ces mitochondries sont associées à la vacuole, celles-ci présenteraient plus de canaux VDAC (Voltage Dependant Anion-selective Channel) (Hacker et al., 2014) nécessaires à l'export de l'ATP (Tsaousis et al., 2008), suggérant une manipulation par le parasite. En effet une telle association permettrait de maximiser fortement l'apport d'ATP vers les stades jeunes du parasite qui sont dépourvus de mitochondries, présentant ainsi un avantage certain. Cette idée est renforcée par le fait que le génome d'*Encephalitozoon cuniculi* présente un certain nombre de transporteurs d'ATP d'origine bactérienne (Tsaousis et al., 2008)(Katinka et al., 2001).

2.3.3. La sporogonie

Une fois la phase de prolifération terminée, le parasite va entrer en sporogonie et commencer à se différencier en sporontes. La distinction entre mérontes et sporontes se fait de manière empirique sur la base de marqueurs visuels. Il est généralement considéré que la sporogonie commence lorsqu'il y a un épaississement de la surface du parasite. Ce phénomène est dû au dépôt de matériel au niveau de cette membrane qui va servir à la formation de la paroi sporale. A ce stade de développement, des divisions vont encore avoir lieu de la même manière que pendant la phase proliférative. Cependant, le nombre de sporoblastes résultant d'un sporonte est variable selon le genre considéré, allant de deux pour *Nosema* (Fries et al., 1996) jusqu'à 100 pour *Pleistophora* (Cali and Takvorian, 2014). Les sporoblastes sont le résultat de la dernière division intracellulaire du parasite et vont se différencier en spores, c'est en effet à ce stade de développement que les structures typiques de la spore se formeront : tube polaire, disque d'ancrage, vacuole et polaroplaste.

Les spores ainsi formées sont donc produites dans le compartiment intracellulaire de la cellule hôte et seront, à la mort de celle-ci, libérées dans le milieu extérieur où elles seront capables d'infecter d'autres cellules hôtes. Bien que cette voie de sortie soit la plus communément admise, d'autres mécanismes ont été observés. Ainsi chez *Nematocida parisii*, parasite du ver modèle *Caenorhabditis elegans*, les spores semblent être capables de sortir de

manière active de la cellule hôte sans provoquer de dommages apparents. Le mécanisme exact n'a pas pu être élucidé, cependant il serait dépendant de l'actine car la mutation de *C. elegans* pour le gène ACT5 (gène codant pour l'actine) provoque une baisse de la production de spores (Szumowski et al., 2012). Un phénomène d'auto-infection est également possible chez certaines espèces. Dans ce cas de figure, les spores néoformées vont entrer en germination directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. Le tube polaire va subir une éversion et injecter le sporoplasme dans une cellule voisine, provoquant le départ d'un nouveau cycle de multiplication.

2.4.Un bon modèle d'interaction hôte-parasite

Bien que les microsporidies aient un cycle qui peut être complexe et que leur biologie ne soit pas encore complètement connue, elles représentent un bon modèle biologique pour les raisons suivantes.

2.4.1. Des parasites ubiquistes

La première raison pour laquelle l'étude des microsporidies est importante, c'est leur impact économique en santé animale et humaine. En effet ayant été trouvé chez des hôtes appartenant à près de la moitié du phylum des métazoaires, elles sont reconnues à ce jour comme les parasites les plus fréquemment observés aussi bien chez les vertébrés que chez les invertébrés. Étant donné le peu de spécialistes étudiant ces parasites, et le fait que plusieurs espèces peuvent parasiter une même espèce hôte (Krebes et al., 2010), on peut supposer que le nombre d'espèces de microsporidies dépasse même celui de leurs hôtes (Keeling and Slamovits, 2004).

La plus grande diversité des microsporidies est observée chez les invertébrés, en particulier chez les insectes et les crustacés, représentant près de 69% des 125 espèces répertoriées dans l'étude de Vossbrinck et Debrunner-Vossbrinck (2005). Leur présence chez les insectes est d'ailleurs la cause de leur renommée. C'est en effet *Nosema bombycis* parasite du ver à soie qui a été la première microsporidie découverte et décrite par Nageli en 1857. Les microsporidies d'insectes sont également revenues sur le devant de la scène à l'occasion des fortes pertes de colonies d'abeilles domestiques qui ont touché les apiculteurs au début des années 2000. L'espèce *N. ceranae*, agent de la nosémose et initialement décrite chez l'abeille asiatique *Apis cerana*, est ainsi considérée comme une des causes de ces fortes pertes (Higes et al., 2008). Un grand nombre d'espèces de microsporidies sont également présentes chez les crustacés où elles sont la cause de forts dommages économiques, avec par exemple

Enterocytozoon hepatopenaei parasite des crevettes et *Myospora metanephrops* parasite du homard (Stentiford et al., 2010; Tourtip et al., 2009).

Dans le cas des vertébrés, ce sont chez les poissons qu'il y a le plus d'espèces de microsporidies avec plus de 160 espèces décrites appartenant à 17 genres différents (Lom and Nilsen, 2003). Chez ces derniers, elles sont surtout étudiées pour leur impact économique en pisciculture, en particulier *Loma salmonae* qui est un problème important pour les élevages de salmonidés (Shaw et al., 2000). De nombreuses microsporidies sont également capables d'infecter des mammifères, et 17 espèces ont actuellement été identifiées chez l'homme, dont la plupart sont des zoonoses acquises par l'intermédiaire d'insectes, de poissons ou d'autres hôtes. Cependant, 4 espèces sont prédominantes (*E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, *E. bienewsi*), les autres étant plutôt des espèces opportunistes (Anane and Attouchi, 2010; Cali and Takvorian, 2004; Meissner et al., 2012).

Ainsi les microsporidies ont un impact économique en santé vétérinaire mais également humaine, elles sont d'ailleurs classées sur la liste de surveillance du « National Institute of Allergy and Infectious Diseases » (NIAID, États-Unis). De plus il existe des microsporidies infectant également un certain nombre d'espèces biologiques modèles telles que *Drosophila melanogaster* (Franzen et al., 2005), *Caenorhabditis elegans* (Troemel et al., 2008), *Dario rerio* (Sanders et al., 2012), offrant ainsi des systèmes biologiques d'étude d'intérêt pour étudier les interactions hôte-parasite.

2.4.2. Des génomes compacts et réduits

La seconde raison de l'intérêt de l'étude des relations hôtes-microsporidies tient aux très fortes simplifications génomiques et fonctionnelles que ces parasites ont subi durant leur adaptation. En effet, une des caractéristiques la plus remarquables des microsporidies est que la simplification cellulaire de ces parasites s'est accompagnée d'une simplification et d'une compaction de leur génome (Corradi and Selmán, 2013). Elles présentent en particulier un faible nombre de gènes, des régions intergéniques réduites et des gènes globalement plus courts que les autres espèces eucaryotes connues (Corradi and Selmán, 2013). Ces caractéristiques ont initialement été observées dans le génome d'*E. cuniculi* (2,9 Mpb), premier génome de parasite eucaryote séquencé (Katinka et al., 2001). Depuis lors, d'autres génomes ont été séquencés montrant une grande diversité de taille et de structure selon les espèces étudiées. On a ainsi des

Table 1. Tailles des génomes et densité génique chez différentes espèces microsporidiennes (d'après Keeling *et al.*, 2014) :

Espèce	Taille estimée du génome (Mpb)	Densité génique (Gène/kpb)	Publications
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	2,9	0,83	(Katinka et al., 2001; Pombert et al., 2013)
<i>Encephalitozoon romaleae</i>	2,5	0,84	(Pombert et al., 2012)
<i>Encephalitozoon hellem</i>	2,5	0,86	(Pombert et al., 2012)
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	2,3	0,86	(Corradi et al., 2010)
<i>Antonospora locustae</i>	5,5	?	(Slamovits et al., 2004)
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	6	0,90	(Akiyoshi et al., 2009)
<i>Nematocita parisii</i> (2 souches)	4,1	0,65	(Cuomo et al., 2012)
<i>Nematocida sp.</i>	4,7	0,59	(Cuomo et al., 2012)
<i>Anncalia (Brachiola) algerae</i> (3 souches)	23	0,09	(Peyretilade et al., 2012)
<i>Spraguea lophii</i>	6,2-7,13	0,51	(Campbell et al., 2013)
<i>Trachipleistophora hominis</i>	8,5-11,5	0,38	(Heinz et al., 2012)
<i>Edhazardia aedis</i>	51,3	0,08	(Desjardins et al., 2015)
<i>Hamiltosporidium tvaerminensis</i>	24	0,21	(Corradi et al., 2009; Keeling et al., 2010)
<i>Nosema bombycis</i>	15,7	0,34	(Pan et al., 2013)
<i>Nosema antheraeae</i>	6,6	0,53	(Pan et al., 2013)
<i>Nosema ceranae</i>	7,9	0,33	(Cornman et al., 2009)

génomomes allant de 2,3 Mpb pour *Encephalitozoon intestinalis* (Corradi et al., 2010), à 51.3 Mpb pour *Edhazardia aedis* (Desjardins et al., 2015) (Tableau 1). Malgré cette forte disparité de tailles, le contenu en gènes semble assez conservé entre les espèces. Ainsi *E. cuniculi* avec son génome réduit (1996 gènes pour 2,9 Mbp ; Katinka et al., 2001) contient presque le même nombre de gènes que l'espèce *A. algerae* qui possède un génome près de 10 fois plus grand (2075 gènes pour 23 Mbp ; Peyretailade et al., 2012). Cette forte variation entre les différents génomes s'explique donc surtout par de fortes différences au niveau de la densité génique, avec des régions intergéniques variant de 119 pb pour *E. cuniculi* à 1,18 kpb pour *Trachipleistophora hominis* (Heinz et al., 2012; Peyretailade et al., 2011). Des nombreux éléments transposables et séquences répétées ont également été retrouvés chez certaines espèces (*Octospora bayeri*, *N. ceranae*, *N. bombycis*, *Vittaforma corneae* et *A. algerae*) ce qui peut également expliquer une partie de la variabilité observée (Peyretailade et al., 2011).

Le nombre de gènes chez les microsporidies reste largement inférieur à celui des autres organismes eucaryotes unicellulaires tel que *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, qui possède environ 6000 gènes (Corradi and Slamovits, 2011). Cette forte réduction du nombre de gènes chez les microsporidies s'est accompagnée d'une perte ou d'un appauvrissement de certaines voies métaboliques. Le cas extrême étant celui d'*E. bienewisi*, qui semble avoir perdu la quasi-totalité des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique et serait potentiellement incapable de digérer les sucres, rendant cette espèce totalement dépendante de son hôte pour son approvisionnement en ATP (Keeling et al., 2010). Une telle réduction n'est rendue possible que par le fait que les microsporidies se reposent entièrement sur la cellule hôte pour pourvoir à leurs besoins métaboliques et énergétiques, ce qui a conduit à les qualifier de parasites extrêmes (Haag et al., 2014). En plus de cette perte totale ou partielle de ces voies métaboliques, les microsporidies ont également perdu la totalité des composants de la voie Tor (Shertz et al., 2010). Cette voie qui permet la perception des nutriments dans le milieu extérieur, entraînant ainsi une adaptation du métabolisme de l'organisme en fonction des nutriments disponibles, est pourtant présente chez presque tous les eucaryotes. Nous pouvons supposer qu'en se développant dans un milieu stable en nutriments (cytoplasme de la cellule hôte), les microsporidies ont perdu le besoin de s'adapter à leur milieu extérieur lors de leurs phases prolifératives.

En contrepartie de ces étonnantes pertes de gènes, les microsporidies ont acquis durant leur évolution un certain nombre de transporteurs qui leur ont permis de développer des capacités uniques pour pirater les ressources énergétiques et métaboliques de l'hôte. Cette acquisition semble s'être en particulier effectuée par le biais de transferts horizontaux. Ainsi chez *E. cuniculi* des gènes de *Rickettsia* ou *Chlamidia* seraient à l'origine de l'acquisition de transporteur d'ATP (Tsaousis et al., 2008). Chez *N. parisii*, des transporteurs de nucléotides proviendraient de gènes de bactéries ou d'arthropodes (Cuomo et al., 2012). Dans cette même étude, Cuomo et al (2012) ont détecté des signaux de sécrétion en amont de gènes codant pour des hexokinases laissant supposer que ces enzymes pourraient être sécrétées directement dans le cytoplasme de la cellule hôte et modifier son métabolisme (Cuomo et al., 2012).

Ainsi au cours de leur adaptation au parasitisme intracellulaire, les microsporidies ont fortement simplifié certaines fonctions biologiques, gardant certainement le minimum de gènes nécessaire à leur interaction avec l'hôte et à leur survie. L'existence possible d'un tel génome minimal en fait ainsi un modèle de choix pour l'étude et le décryptage des interactions hôte-parasite.

3. Les modèles de microsporidies étudiés au cours de ma thèse

Afin d'étudier les interactions hôtes-microsporidies à différents niveaux d'intégration, deux modèles infectieux ont été utilisés au cours de ma thèse. Un modèle cellulaire composé de la microsporidie *A. algerae* cultivée sur des cellules fibroblastiques humaines (HFF), et un modèle tissulaire avec la microsporidie *N. ceranae* infectant le tube digestif de l'abeille domestique *A. mellifera*. Ces deux modèles sont présentés en détail dans les parties suivantes.

3.1. *Anncaliia algerae* – cellules fibroblastiques humaines : un modèle cellulaire

3.1.1. *Anncaliia algerae*

A. algerae, auparavant nommée *Nosema algerae* puis *Brachiola algerae* avant d'être rattachée au genre *Anncaliia* en 2006 (Franzen et al., 2006), est une microsporidie présentant un spectre d'hôtes étonnamment large. Originellement isolée à partir de larves de moustiques (*Anopheles stephensi*) en 1970 (Vavra and Undeen, 1970), cette espèce peut également infecter d'autres genres de moustiques (*Aedes*, *Culex*, *Armigeres*, *Wyeomyia*) ainsi que différents genres d'invertébrés (*Coleoptera*, *Diptera*, *Hemiptera*, *Lepidoptera*, *Digenea*, *Decapoda*, *Megaloptera*,

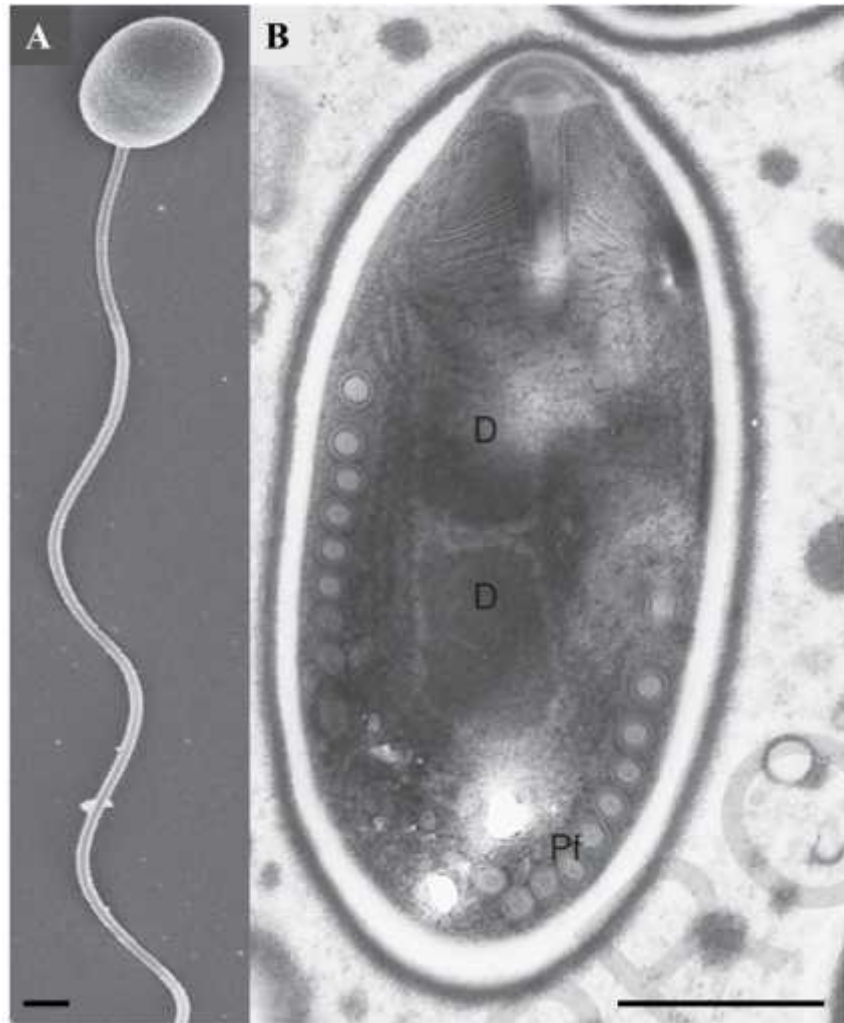


Figure 11: Spores d'*Anncaliia algerae* en microscopie électronique:

(A) Photographie de microscopie électronique à balayage d'une spore d'*A. algerae* après extrusion du tube polaire (D'après Cali et Takvorian, 2014). (B) Photographie en microscopie électronique à transmission d'une spore d'*A. algerae*. (D) représente les deux noyaux caractéristiques de cette espèce diplocaryotique, **Pf** (Polar filament) indique les sections de spires du tube polaire qui est enroulé dans la spore. L'échelle représente 0.5 μm (d'après Cali *et al.*, 2002).

Odonata, *Orthoptera*) (Becnel et al., 2005). Concernant les mammifères, l'interaction a d'abord été confirmée chez la souris, où des essais d'infection au niveau de la queue et des pattes ont mené à des infections localisées (Becnel et al., 2005). Par la suite, l'administration oculaire de spores à des souris immunodéficientes a conduit à une sévère infection hépatique, laissant supposer que ce parasite était limité par la température corporelle et l'immunité des mammifères, et ne présenterait donc pas de risque important pour l'homme (Koudela et al., 2001). De façon surprenante, des cas cliniques, dont certains fatals, ont été documentés chez des personnes immunodéprimées (Watts et al., 2014).

A. algerae a pu être cultivée avec succès dans un grand nombre de culture de cellules de mammifères telles que: des cellules rénales de porc, de lapin (RK-13) mais aussi sur des lignées fibroblastiques humaine (HFF, MRC-5). Des cultures ont également pu être réalisées sur des cellules d'insectes (lignées de lépidoptères et de diptères) et plus récemment sur des cellules de poissons (Monaghan et al., 2011). De par sa capacité à se développer sur une grande diversité de types cellulaires ainsi qu'à des températures élevées (37°C), ce qui est rare pour une microsporidie d'insectes, *A. algerae* démontre une étonnante capacité d'adaptation. Cela en fait donc un modèle privilégié pour l'étude des interactions hôte-parasite et l'adaptation à des environnements différents.

3.1.1.1. Cycle de vie

La spore environnementale va, à l'aide du tube polaire, injecter le sporoplasme directement dans la cellule hôte, cependant dans certains cas cette extrusion peut être précédée d'une phagocytose (Takvorian et al., 2005). Durant l'étape de mérogonie qui suivra, les mérontes vont se multiplier par fissions binaires, puis durant la sporogonie, se différencier en sporontes puis en sporoplastes qui vont former les spores matures (Cali and Takvorian, 2014). Sur cellules HFF, le temps de réalisation du cycle complet aboutissant à la production de nouvelles spores semble dépendre de la température, il s'achève ainsi en 4-5 jours à 37°C et 3 jours à 33°C (Leitch and Ceballos, 2008). En culture cellulaire, les spores néoformées semblent capables d'infecter directement les cellules voisines comme cela a déjà été vu pour d'autres espèces de microsporidies (Takvorian et al., 2005).

A. algerae présente certaines spécificités, ainsi tous ses stades de développement sont diplocaryotiques (Figure 11), et se développent directement au contact du cytoplasme de la

cellule (Cali and Takvorian, 2014) sans mise en place de vacuole parasitophore que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Les spores environnementales mesurent approximativement 4,4 x 2,8 µm et les génomes de 3 souches qui ont été séquencées se distinguent par leurs taille relativement haute (de l'ordre de 23 Mpb) pour des génomes de microsporidies (Peyretilade et al., 2012). Cette taille relativement élevée pour un génome de microsporidie ne s'explique ni par une augmentation du nombre de gènes ou de la taille des régions intergéniques qui sont proches de ce qui est retrouvé chez les autres espèces. Cependant, le génome présente un plus grand nombre de gènes codant pour des transporteurs et des kinases, qui lui permettraient une meilleure capacité d'adaptation expliquant potentiellement son spectre d'hôtes plus large (Peyretilade et al., 2012). Le grand nombre de séquences codant pour des éléments transposables, qui ont été détectées dans le génome (475), contribue également à l'augmentation de la taille du génome et probablement à sa plus grande capacité d'adaptation (Peyretilade et al., 2012).

3.1.2. Interaction avec l'hôte

Les cellules HFF (Human Foreskin Fibroblasts) sont une lignée fibroblastique humaine déposée à l'ATCC en 2003 (ATCC® SCRC-1041), provenant de prépuces de nouveaux nés. Ces cellules, couramment utilisées en recherche médicale, ont été à l'origine développées afin de servir de cellules nourricières lors de la mise en culture de cellules souches embryonnaires (Hovatta et al., 2003). Cette lignée cellulaire a été choisie car sa culture est relativement simple et rapide, de plus, sa biologie est très bien connue. Il n'existe à ce jour aucune publication portant sur l'interaction moléculaire *A. algerae* – cellules humaines. Cependant, le fait qu'elle ne puisse se multiplier majoritairement chez des patients immunodéprimés laisse supposer que les réponses immunitaires cellulaires et adaptatives sont capables de lutter efficacement contre le parasite (Didier et Khan, 2014). Les cellules HFF en culture ne pourront exprimer que la réponse innée. Cependant les voies de reconnaissance des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PRR : Pattern Recognition Receptors), les voies de signalisation associées (Toll like receptor) seront fonctionnelles ainsi que les voies de production de cytokines (Interferons , , , Facteur de Nécrose Tumorale...).



Figure 12: Histoire évolutive de l'abeille domestique (*Apis mellifera*).

L'espèce *Apis mellifera* serait issue d'une abeille venue du Moyen-Orient (**lignée O**), qui aurait par la suite divergé en quatre rameaux évolutifs à l'origine des 26 sous-espèces actuellement observées. La **lignée O** comprend les sous-espèces orientales, la **lignée A** ayant donné naissance aux sous-espèces africaines, la **lignée C** comprenant les sous-espèces du sud de l'Europe et la **lignée M** à l'origine des sous-espèces *Apis mellifera mellifera* dans le nord de l'Europe et *A. mellifera iberica* en Espagne (d'après Bruneau et al., 2006 et Ruttner, 1988).

3.2. Le modèle *Nosema ceranae* – *Apis mellifera*

3.2.1. L'abeille un modèle d'intérêt

3.2.1.1. Un insecte présent dans le monde entier

Les abeilles sont des insectes appartenant au genre des hyménoptères. Le genre *Apis* représente les abeilles dites mellifères qui comprend 9 espèces distinctes (Cao et al., 2012) que l'on retrouve dans le monde entier. Les espèces européennes (*A. mellifera*) présentent une distribution qui peut aller de l'Afrique sub-saharienne au nord de l'Europe en passant par l'Asie. Elles ont été capables de s'adapter à une très large variété de biotopes, de la sécheresse des oasis du désert africain à l'altitude des Alpes, aux froids des franges des toundras. Le groupe représenté par *A. mellifera* aurait évolué à partir d'une abeille du Moyen Orient issue de l'abeille asiatique *Apis cerana* pour former 3 grands groupes phylogénétiquement distincts (Bruneau et al., 2006; Ruttner, 1988): les abeilles dites Africaines, Ouest européennes et Est-européennes (Zayed and Whitfield, 2008). Les populations de ces 3 rameaux auraient évolué séparément pour donner plus de 26 sous-espèces pour l'abeille domestique (figure 12).

Afin de s'adapter au climat européen *A. mellifera* a développé la capacité à collecter de grandes quantités de ressources alimentaires en peu de temps et à les stocker pour passer l'hiver. C'est cette caractéristique qui a conduit l'homme à la domestiquer et indirectement contribuer à sa dissémination à travers le monde. Ainsi il est admis que l'expansion de l'abeille européenne a été le résultat du transport délibéré par l'homme. Elle a ainsi connue une forte expansion au 17^{ème} siècle, époque à laquelle elle a été introduite en Amérique par les colons (Zayed and Whitfield, 2008). Ainsi, par le biais de l'élevage par l'homme, le nombre de colonies d'abeilles aurait augmenté de près de 45% au cours des 50 dernières années (Aizen and Harder, 2009), conduisant à une estimation de près de 81 millions de colonies en 2013 selon la Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (Figure 13). Cependant cette hausse globale du nombre de colonies d'abeilles ne doit pas occulter de fortes disparités géographiques. En effet, si certains pays comme la Chine, la Turquie ou l'Argentine ont vu leur nombre de colonies augmenter de façon significative, d'autres pays, comme les Etats-Unis ou certains pays d'Europe ont de leur côté connu une forte baisse du nombre de colonies recensées (Figure 14). Dans ces deux régions, le nombre de colonies a été divisé par deux entre 1961 et 2013, passant de 58 à 32 millions pour l'Amérique du Nord et de 37 à 20 millions pour l'Europe de l'Ouest.

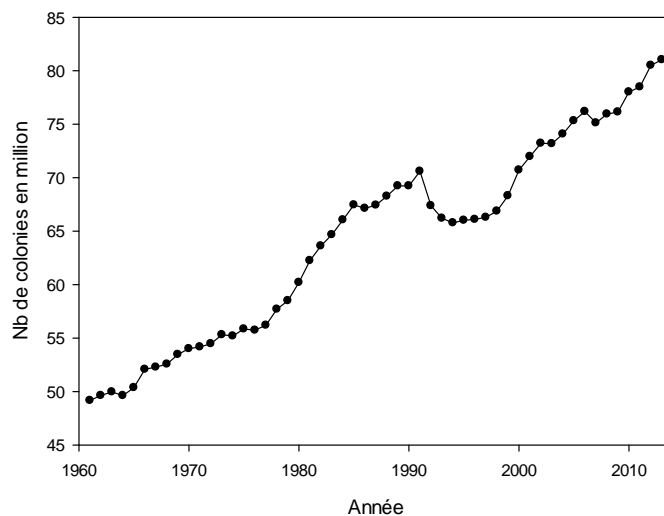


Figure 13: Evolution du nombre de colonies d'abeilles dans le monde de 1961 à 2013.
(D'après les chiffres de la FAO, FAOSTAT, 2014).

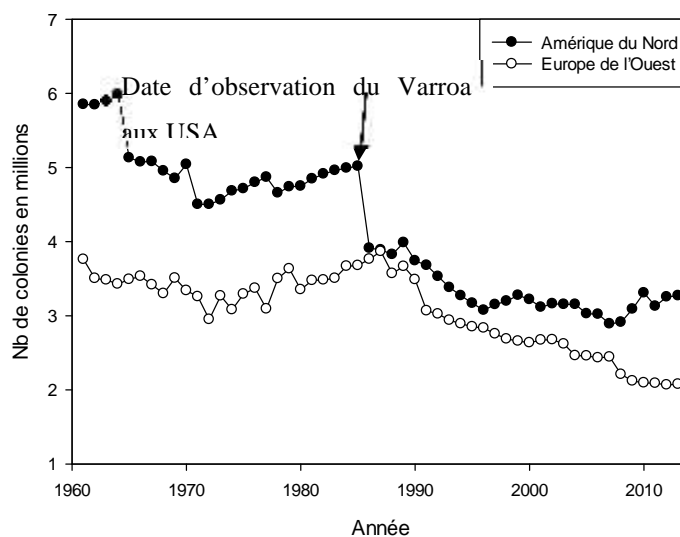


Figure 14: Evolution du nombre de colonies en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest de 1961 à 2013 (D'après les chiffres de la FAO, FAOSTAT, 2014).

3.2.1.2. Un rôle écologique et économique important

Les angiospermes (plantes à fleurs) et les insectes partagent une longue histoire évolutive. Ces deux acteurs s'apportent des bénéfices réciproques dans le cadre de leur relation mutualiste. Le nectar et le pollen sont ainsi nécessaires pour la survie de certaines espèces animales telles que les abeilles ou certains oiseaux tandis que ceux-ci, en transportant le pollen de fleur à fleur, permettent la reproduction d'un grand nombre d'espèces végétales. De nombreuses plantes sauvages et agricoles dépendent de la pollinisation par les animaux. Ainsi hormis certaines céréales et certains légumes, plus de 308 000 espèces d'angiospermes dépendent des pollinisateurs pour assurer leur reproduction (Ollerton et al., 2011). Ce chiffre représente près de 87% de l'ensemble des plantes à fleurs connues (Klein et al., 2007; Ollerton et al., 2011). Par leur activité, les pollinisateurs permettent également le maintien de la biodiversité car il a été observé qu'il existait une corrélation positive entre la diversité des plantes et la diversité des pollinisateurs disponibles (Paudel et al., 2015).

Du point de vue économique, les pollinisateurs ont également un rôle de première importance. En effet, ce service écosystémique a été estimé comme étant nécessaire à près de 75% de la production de plantes d'intérêt économique (Klein et al., 2007). Le résultat de cette étude est plus contrasté si on se place au niveau du volume de production agricole, puisque le pourcentage tombe alors à 35%. Cependant, pour de nombreuses espèces agricoles la pollinisation par les insectes va permettre l'obtention de plus forts rendements ainsi qu'une meilleure qualité de semence (Bommarco et al., 2012). Le service écosystémique des pollinisateurs est donc central pour la production de nourriture, le coût de ce service a d'ailleurs été estimé à près de 153 milliards de dollars ce qui représente 9,5% de la valeur totale de la production annuelle mondiale (Gallai et al., 2009).

L'abeille européenne (*A. mellifera*), qui est l'espèce d'abeille la plus élevée par l'homme, est considérée comme un acteur majeur de la pollinisation (Klein et al., 2007; Le Conte and Navajas, 2008). Pour ces raisons, elle fait partie des espèces dont l'impact sur le service écosystémique a été le plus étudié. Cependant, bien qu'elle contribue à la pollinisation d'un large spectre d'espèces, son rôle a certainement été surévalué. Il apparaît en effet que les autres pollinisateurs sauvages (autres espèces d'abeilles, de lépidoptères, d'hyménoptères, de diptères, de coléoptères...) peuvent être capables de remplacer le service assuré par l'abeille européenne si

leur diversité est suffisante (Breeze et al., 2011; Rader et al., 2012). L'abeille domestique reste, malgré tout, un modèle de choix pour étudier la santé des pollinisateurs. On peut donc supposer que la diminution importante des colonies d'abeilles observée dans certaines régions du monde, reflète également une baisse du nombre d'insectes pollinisateurs sauvages, ce qui a déjà été constaté pour les bourdons (Biesmeijer et al., 2006; Garibaldi et al., 2014; Grixti et al., 2009).

3.2.1.3. Le déclin de l'abeille mellifère

La majorité des pertes de colonies observées en Europe et aux Etats-Unis correspondent à des pertes en sortie d'hivernage qui est la période la plus critique pour la survie de la colonie. Si des taux de 20% de pertes durant cette période sont considérés comme acceptables, ceux observés ces dernières années sont largement supérieurs. Ainsi en 2007 aux États-Unis, cette perte a atteint 35,8%. Ce chiffre cache cependant de fortes disparités entre les régions et les ruchers considérés, avec des pertes de 56% pour le Michigan à 17% pour l'Arkansas, certains apiculteurs ayant même perdu jusqu'à 90% de leurs colonies (Ellis et al., 2010; vanEngelsdorp et al., 2008). Aux Etats-Unis une partie des colonies perdues présentait les mêmes symptômes qui ont été regroupés et définie comme le syndrome « CCD » (Colony Collapse Disorder) qui désigne un syndrome de dépopulation des ruches se caractérisant par l'absence de cadavres d'abeilles à l'intérieur de la colonie ou à proximité des ruches. Ce terme CCD a été par la suite utilisé à tort pour désigner toutes les pertes de colonies observées dans les écosystèmes continentaux, or de nombreuses pertes hivernales ne présentaient pas ces caractéristiques.

3.2.1.4. Les différents facteurs impliqués dans les pertes de colonies

Des études prospectives ont été menées afin de trouver les causes des effondrements de colonies. De nombreux facteurs ont été suspectés, tels que le virus IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus), l'acarien parasite *Varroa destructor* et le champignon *N. ceranae* ou encore les pesticides (Higes et al., 2010b; vanEngelsdorp et al., 2009). Cependant, aucun facteur ne semble pouvoir expliquer à lui seul l'intégralité des pertes observées et l'idée d'une cause multifactorielle a émergé et semble, à présent, être acceptée dans la communauté scientifique (Higes et al., 2013b; Staveley et al., 2014; vanEngelsdorp and Meixner, 2010). De fait, dans son environnement naturel l'abeille peut être confrontée à un grand nombre de stress biotiques et abiotiques pouvant influencer directement la survie des colonies.

3.2.1.4.1. Les facteurs abiotiques

Les preuves de l'impact du changement climatique sur les pollinisateurs proviennent pour l'essentiel d'études sur les papillons. Il a ainsi été montré que le changement climatique récent avait déjà modifié la distribution de certaines espèces (Hickling et al., 2006). Les changements qui vont s'amplifier dans le futur risquent d'avoir des impacts encore plus forts sur les communautés d'insectes pollinisateurs, dont les abeilles (Potts et al., 2010). Cet effet pourrait être direct en influant sur le comportement des abeilles et de leurs colonies, ou indirect en modifiant la phénologie des plantes utilisées par l'abeille pour sa nourriture en nectar et en pollen.

L'activité humaine ainsi que les nouvelles pratiques agricoles ont également un impact important sur la répartition et la diversité des insectes pollinisateurs. Ces pratiques ont engendré une modification profonde des paysages qui a eu pour résultat une fragmentation et une perte d'habitats pour les insectes pollinisateurs, réduisant de fait la diversité et la quantité de nourriture disponible. Cela a eu pour résultat de conduire à un affaiblissement des communautés de pollinisateurs (Cane et al., 2006). Ce phénomène pourrait donc mettre les abeilles dans un état de stress nutritionnel et donc les rendre plus sensibles à d'autres stress environnementaux ainsi qu'à des pathogènes. Plusieurs auteurs pensent d'ailleurs qu'il pourrait être impliqué dans un certain nombre de pertes observées à travers le monde ces dernières années (Naug, 2009; vanEngelsdorp and Meixner, 2010).

En parallèle à ces changements de paysage, l'ère de l'agriculture intensive est également responsable de l'arrivée de nombreux xénobiotiques dans l'environnement, en particulier des pesticides. Ces derniers peuvent fortement influencer la santé des colonies d'abeilles exposées et certain nombre ont été retrouvés dans les matrices apicoles (Chauzat et al., 2006). Ces pesticides, principalement les néonicotinoïdes seraient responsables d'une partie des pertes de colonies d'abeilles observées dans certains pays (Goulson et al., 2015; vanEngelsdorp and Meixner, 2010), ce qui a conduit récemment l'Europe à les interdire ou à en limiter l'usage afin de réduire l'exposition des abeilles (Regulation (EU) No 485/2013).

3.2.1.4.2. Les facteurs biotiques

Depuis peu, l'abeille européenne doit également faire face à une nouvelle menace sous la forme d'une espèce de frelon invasive. Le frelon asiatique (*Vespa velutina*) est un hyménoptère cousin du frelon européen (*Vespa crabro*), qui a été signalé pour la première fois en France en

2004. Celui-ci s'est très rapidement répandu (6 départements touchés en 2006, 50 en 2011) (Villemant et al., 2006) et il a maintenant dépassé nos frontières puisqu'il a déjà été signalé en Espagne en 2010, ainsi qu'au Portugal et en Belgique en 2011 (Schwartz et al., 2012). Cette rapide dissémination a fortement inquiété les apiculteurs, car comme son cousin européen, le frelon asiatique est majoritairement apivore et aurait une forte prédilection pour les abeilles. Pour capturer ses proies, il se place en vol stationnaire à l'entrée de la ruche et capture les butineuses ce qui peut affaiblir la colonie si le prélèvement est trop important.

L'abeille est également confrontée à un certain nombre de pathogènes potentiellement capables d'avoir un impact sur la santé de la colonie. Lors d'un épisode du CCD aux Etats-Unis, une plus forte prévalence de pathogènes a été retrouvée dans les ruchers touchés par le phénomène (vanEngelsdorp et al., 2008). En particulier des bactéries, telles que *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius* respectivement responsables de la loque américaine et de la loque européenne sont les deux principaux pathogènes bactériens ayant un impact significatif sur la santé de l'abeille (Forsgren, 2010; Genersch, 2010). Ces deux bactéries vont affecter le couvain non operculé au sein duquel elles vont se multiplier. *M. plutonius* n'étant pas capable de sporuler, elle est de fait beaucoup moins contagieuse et la loque européenne provoque généralement moins de ravages. Une vingtaine de virus pathogènes ont également été recensés chez l'abeille à ce jour (Mutinelli, 2011). Ils peuvent affecter tous les stades de développement, de l'œuf à l'abeille adulte et toutes les castes. Ils sont souvent latents et ne provoquent pas de symptômes, mais peuvent dans certaines conditions fortement réduire la durée de vie des abeilles infectées. Parmi les plus importants, il faut citer le virus aux ailes déformées (DWV: Deformed Wing Virus) ou le virus israélien de la paralysie aigue (IAPV) dont les prévalences ont été mesurées comme plus importantes dans les colonies présentant des signes de dépopulation (vanEngelsdorp and Meixner, 2010; vanEngelsdorp et al., 2008). Il faut souligner que dans le cas du DWV, la forme symptomatique n'est possible que par la transmission du virus à la puppe par le varroa (Tentcheva et al., 2006), une des principales menaces pour l'abeille (Rosenkranz et al., 2010).

Varroa destructor, qui a été identifiée en 2000 (Anderson and Trueman, 2000), serait issue de l'adaptation de l'espèce *Varroa jacobsoni*, parasite naturel de l'abeille asiatique (*A. cerana*) à l'abeille européenne (*A. mellifera*). Cet acarien parasite c'est par la suite disséminé

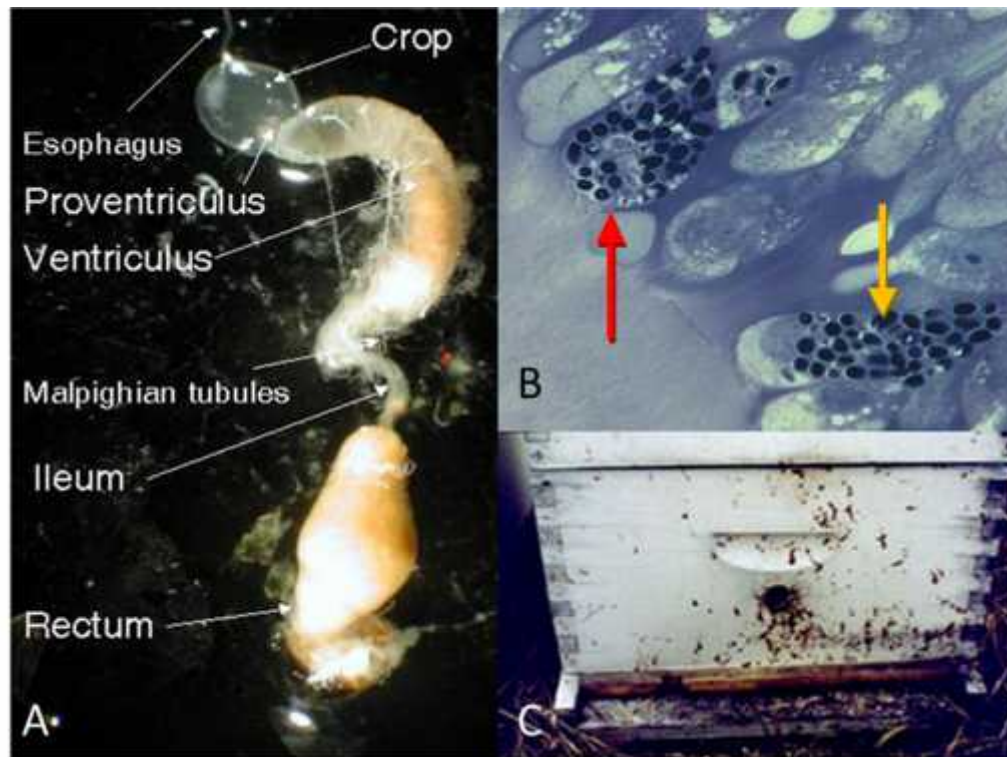


Figure 15: Nosémosse des abeilles, tissus ciblés et symptômes.

(A) Après avoir migré jusque dans la partie inférieure de l'appareil digestif de l'abeille, *N. ceranae* infecte les entérocytes de l'intestin moyen (également appelé ventricule). (B) Au niveau de la colonie on observe des traces diarrhéiques à l'entrée de la ruche (C). La flèche rouge indique un entérocyte infecté, et la flèche jaune un stade de *N. ceranae* (D'après Dussaubat, 2013).

dans le monde entier, en France en 1982 et aux Etats-Unis en 1987. Peu de régions du monde sont à ce jour épargnées (Australie, Afrique Centrale, ile de la Réunion...) (Rosenkranz et al., 2010). *V. destructor* présente un risque modéré pour l'abeille asiatique, car elle possède un comportement hygiénique lui permettant de lutter efficacement. Le parasite a par contre un impact très important sur l'abeille européenne qui n'a pas encore développé de stratégie de défense efficace. Sans un traitement vétérinaire, les colonies ne sont en effet pas capables de survivre plus de deux ou trois ans. Cet acarien présente un cycle de vie fortement lié à celui de l'abeille, puisqu'il se reproduit au sein du couvain operculé et se nourrit d'hémolymphe de larves et d'adultes. Ces effets négatifs sont dus à l'action spoliatrice mais aussi à la transmission de virus dangereux pour l'abeille (IAPV,DWV) (Dainat et al., 2012).

La nosébose est couramment citée comme potentiellement responsable de l'effondrement des colonies d'abeilles. Cette maladie intestinale est causée par une microsporidie appartenant au genre *Nosema* : *N. apis* et *N. ceranae*. Bien qu'aucun lien direct n'ait pu être démontré à ce jour, *N. ceranae* est suspectée de jouer un rôle non négligeable dans les pertes de colonies d'abeilles (Higes et al., 2008). Il a en particulier été montré que l'infection pouvait, en synergie avec des doses sublétales d'insecticides, provoquer une surmortalité (Aufauvre et al., 2012; Vidau et al., 2011).

3.2.2. *Nosema ceranae* un acteur probable du déclin de l'abeille

3.2.2.1. *Nosema ceranae* et *N. apis* deux pathogènes responsables de la nosébose

De toutes les pathologies observées dans le monde, la nosébose est certainement celle qui présente la plus forte prévalence (Fries, 2010). La pathologie liée à *N. apis* est connue depuis longtemps par les apiculteurs. Elle se caractérise par des abeilles pouvant présenter des tremblements, un abdomen gonflé ainsi que des traces de défécation à l'entrée des ruches (Figure 15). Généralement saisonnière, cette maladie peut dans certains cas, provoquer une baisse de la production de couvain et de la taille de la colonie (Higes et al., 2010c). Ainsi, l'infection de l'abeille par *N. apis* est un fait établi depuis près de 100 ans (Zander, 1909). Les premières descriptions de corpuscules ovales indiquant une infection fongique ont été faites en 1857 par Donhov et en 1858 par Higgins (Higes et al., 2010c). Au contraire, *N. ceranae* n'a été décrite pour la première fois qu'en 1996 par un chercheur suédois, Ingemar Fries, chez l'abeille

domestique *A. mellifera* (Fries et al., 1996). Ce n'est qu'après la mise au point d'un outil de diagnostic moléculaire que *N. ceranae* a été détectée chez *A. mellifera* dans des échantillons provenant de toute l'Europe (Huang et al., 2007; Martin-Hernandez et al., 2007). Il est suspecté que *N. ceranae* ait été présente bien avant. Des études rétrospectives ayant suggéré sa présence chez l'abeille domestique depuis 1998 en Finlande (Higes et al., 2006; Martin-Hernandez et al., 2007; Paxton et al., 2007). *N. ceranae* est issue de l'abeille asiatique et aurait été importée en Europe par les échanges commerciaux (Botias et al., 2012). A ce jour, il a été montré que *N. ceranae* est présente sur les cinq continents (Giersch et al., 2009; Klee et al., 2007; Martin-Hernandez et al., 2007) et que l'infection par cette espèce semble présenter un tableau symptomatique plus virulent, probablement lié au manque d'adaptation du parasite à son nouvel hôte.

3.2.2.2. *Nosema ceranae* remplace-t-elle *Nosema apis* ?

Les échanges commerciaux de matériels apicoles et de colonies d'abeilles sont très répandus et ont probablement contribué à la dissémination de *N. ceranae* dont la distribution est dorénavant mondiale (Paxton et al., 2007). Ainsi au cours de ces dernières années, la prévalence de *N. ceranae* a fortement augmenté comparativement à *N. apis* (Klee et al., 2007; Paxton et al., 2007), ce qui a amené un certain nombre d'auteurs à se poser la question du remplacement de *N. apis* par *N. ceranae*. Bien que cette hypothèse ait été suggérée par plusieurs auteurs (Chen et al., 2008; Klee et al., 2007; Yoshiyama and Kimura, 2011), il n'existe à ce jour pas de preuve formelle de ce phénomène. La forte prévalence de *N. ceranae* n'est d'ailleurs pas une réalité dans tous les pays. En Suède et au Royaume-Uni ainsi que dans d'autres pays du nord de l'Europe, *N. apis* reste encore majoritairement retrouvée dans les ruches (Gisder et al., 2010). Des études menées sur des co-infections n'ont pas pu montrer d'avantages compétitifs en faveur de *N. ceranae*, que ce soit au niveau de la virulence et de la production de spores (Forsgren and Fries, 2010) ou au niveau de la vitesse de multiplication du parasite (Milbrath et al., 2015). L'apparente augmentation de la prévalence de *N. ceranae* au détriment de *N. apis* ne serait donc pas due à une meilleure compétitivité du parasite, mais certainement à des facteurs environnementaux. Il a d'ailleurs été montré que *N. ceranae* perdait sa capacité infectieuse après une courte exposition à 4°C (Gisder et al., 2010), ce qui l'empêcherait de survivre à la période hivernale dans les zones septentrionales et expliquerait sa moindre prévalence dans ces régions.

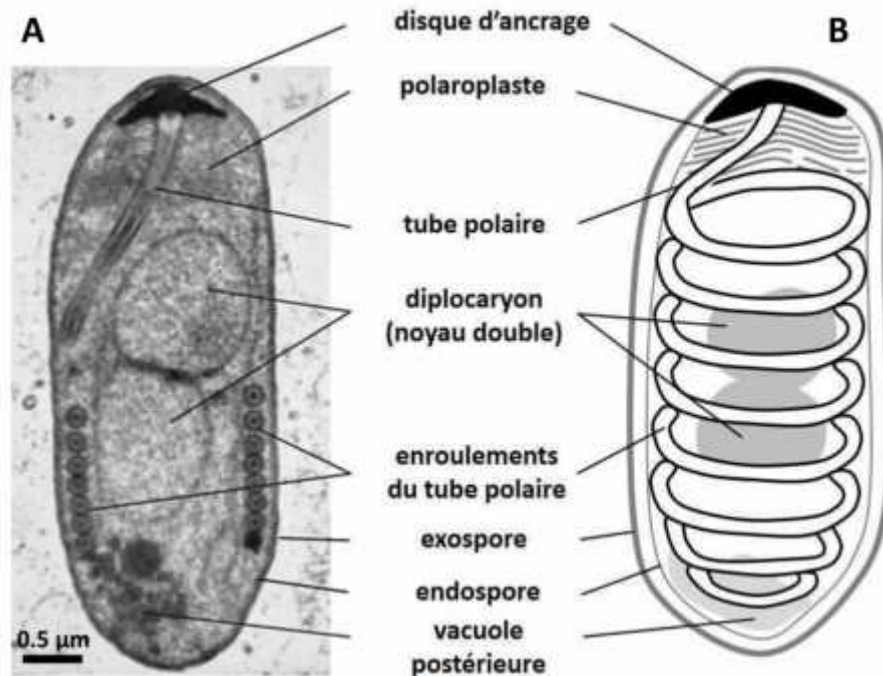


Figure 16: Ultrastructure d'une spore de *Nosema ceranae*

(A) Photographie d'une spore en microscopie électronique à transmission, (B) schéma montrant les différentes structures internes de la spore (modifiée d'après Solter, 2010).

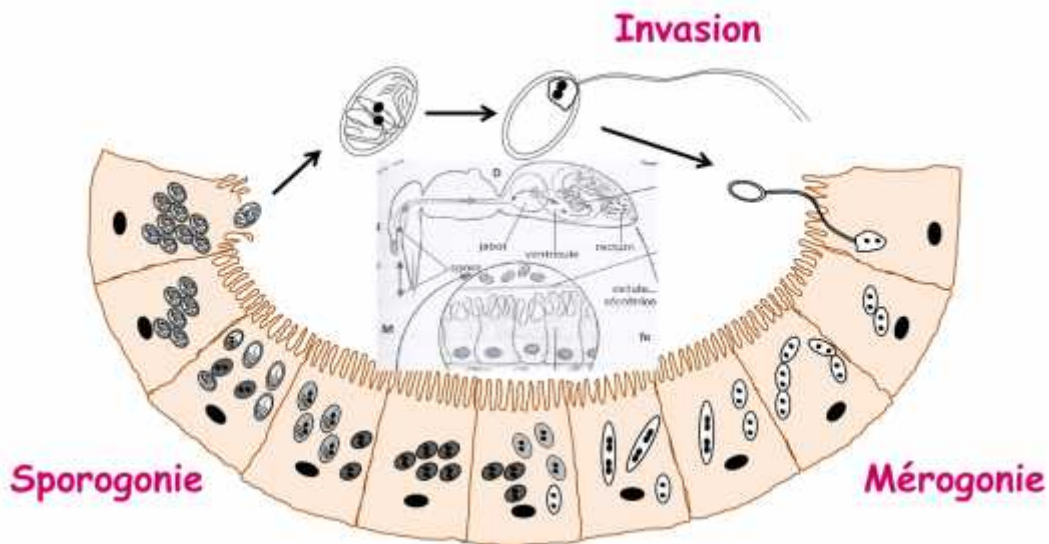


Figure 17: Cycle de développement de *Nosema ceranae* dans l'épithélium intestinal

Après dévagination, le tube polaire injecte le sporoplasme dans la cellule hôte. On observe ensuite une première phase de multiplication asexuée appelé mérogonie, puis une phase de différenciation, la sporogonie, aboutissant à la formation de spores qui seront libérées dans la lumière intestinale.

3.2.2.3. Biologie et cycle de vie de *Nosema ceranae*

N. ceranae a d'abord été détectée chez les ouvrières (Fries et al., 1996) puis plus récemment chez les faux bourdons et les reines (Traver and Fell, 2011). Bien qu'elle ait déjà été détectée dans d'autres tissus par PCR (glandes hypopharyngées, glandes mandibulaires et salivaires, tubes de Malpighi, corps gras et sac à venin) (Chen et al., 2009), son développement n'a pour l'instant été confirmé par microscopie qu'au niveau de l'épithélium de l'intestin moyen de l'abeille. La transmission serait principalement horizontale, de type feco-orale. L'infection a lieu lors de l'ingestion de spores au cours des activités de nettoyage de la ruche (Higes et al., 2010a) et serait favorisée par le comportement de trophallaxie (échange de nourriture) (Smith, 2012)

La spore de *N. ceranae* est ovoïde et mesure environ $4,7 \times 3,7 \mu\text{m}$ (Fries et al., 1996). Elle possède une paroi protectrice composée d'une exospore de 14 – 17 nm et d'une endospore chitineuse (Figure 16). Le tube polaire enroulé en spirales (18 à 23 spires) dans la partie postérieure de la spore permet de la différencier de l'espèce *N. apis* qui peut présenter jusqu'à 44 spires (Chen et al., 2009; Fries et al., 1996).

Il existe à ce jour assez peu de données sur le cycle de vie de *N. ceranae* chez l'abeille, il faut donc se baser sur les cycles de microsporidies mieux décrits, tel que celui d'*A. algerae* par exemple avec laquelle elle partage un certain nombre de similitudes. En effet, comme cette dernière espèce, *N. ceranae* se multiplie directement au contact du cytoplasme de la cellule hôte et tous ses stades de développement sont diplocaryotiques (Fries et al., 1996). L'infection commence par l'ingestion de spores matures par l'abeille adulte, une fois dans la lumière intestinale, la spore va, par éversion du tube polaire, injecter le sporoplasme à l'intérieur du cytoplasme des cellules intestinales (Cali and Takvorian, 2014) (Figure 17).

Lors de la phase de mérogonie, les parasites vont se multiplier par fission binaire et former des mérontes appariés qui vont continuer à se diviser de la même façon (Fries et al., 1996; Higes et al., 2010c). Durant cette phase, les parasites semblent être capables de modifier l'organisation de la cellule hôte. On voit en effet les mitochondries se placer autour des foyers infectieux, ceux-ci pouvant servir d'apport d'ATP aux parasites (Keeling and Fast, 2002).

Lors de la sporogonie qui suit, les parasites se divisent une dernière fois pour donner des sporoblastes qui, après acquisition des différentes structures caractéristiques du stade sporal (tube polaire, vacuole postérieure, polaroplaste...), vont par la suite se différencier en spores matures avec la formation de la paroi (Keeling and Fast, 2002).

Les spores matures sont par la suite libérées dans le lumen par lyse des cellules infectées. Cependant il semblerait qu'il y ait également formation de spores auto-infectieuses capables d'infecter directement les cellules voisines (Higes et al., 2010c, 2007). La durée totale du cycle semble être relativement rapide, des spores matures pouvant être détectées 3 jours après l'infection. Il est courant de retrouver des charges parasitaires de plusieurs millions par abeille en conditions naturelles (Higes et al., 2007; Paxton et al., 2007).

Le génome de *N. ceranae* a été séquencé récemment (Cornman et al., 2009). Comme pour la plupart des autres espèces de microsporidies, ce génome est de taille relativement réduite (7,7 Mb pour 2342 gènes prédits) et fortement enrichi en bases AT (74%) (Pan et al., 2013; Peyretilade et al., 2012). Ce génome contient une majorité de gènes impliqués dans la croissance du parasite tandis qu'une fraction plus réduite correspondrait à la réponse aux stress (Cornman et al., 2009). Sur la totalité du protéome prédit, 89 protéines présentent des peptides signaux et pourraient donc jouer un rôle dans les interactions avec l'hôte et être de potentiels effecteurs de virulence du parasite (Cornman et al., 2009).

3.2.3. L'interaction *Nosema ceranae* – *Apis mellifera*

Pour lutter contre *N. ceranae*, l'abeille (insecte social) dispose de deux niveaux d'immunité, l'immunité individuelle et l'immunité sociale.

3.2.3.1. Immunité individuelle

Pour atteindre les cellules intestinales, *N. ceranae* doit traverser les différentes barrières physiques présentes chez l'abeille, en particulier la membrane péritrophique. Cette membrane chitineuse semi-perméable protège les cellules épithéliales de l'intestin tout en laissant passer les nutriments (Ferrandon, 2013). Il n'y a à ce jour, aucune donnée sur la manière qu'utilise *N. ceranae* pour traverser cette membrane. Une fois cette barrière physique franchie, le parasite doit aussi faire face au système immunitaire de l'abeille. À ce jour, peu de données sont disponibles

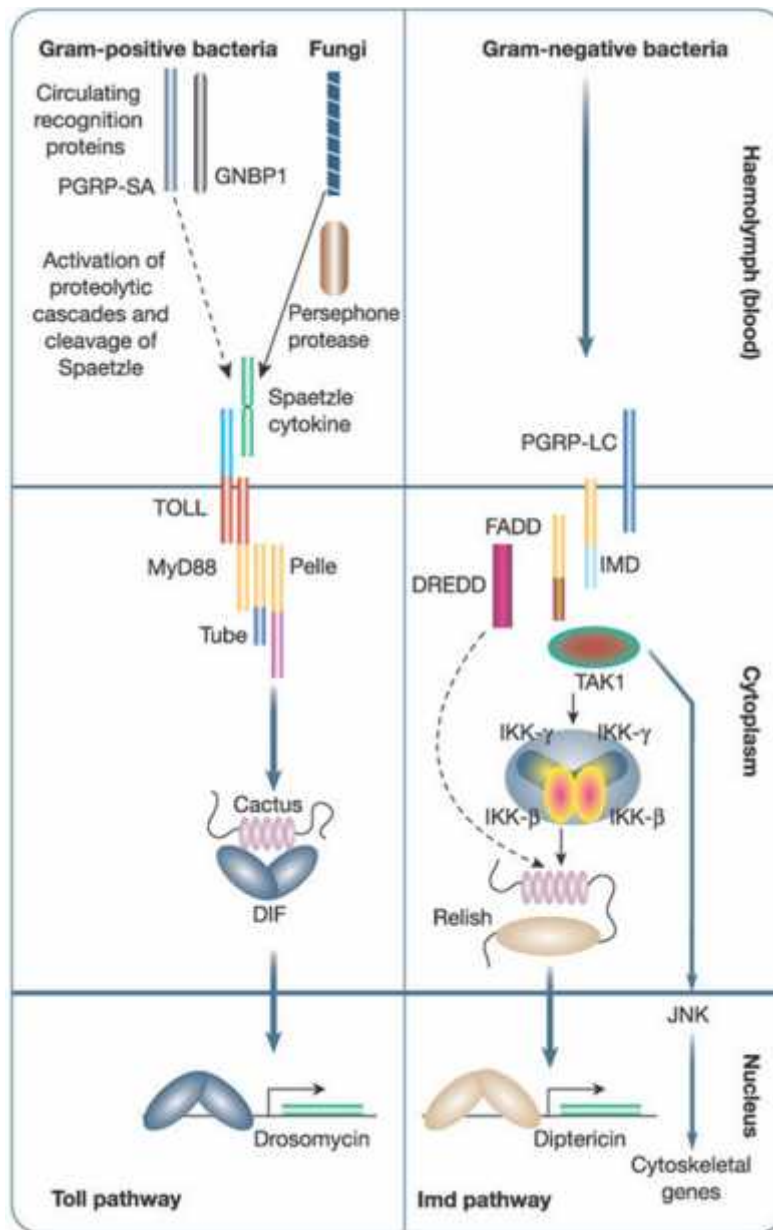


Figure 18: Réponse immunitaire humorale chez les insectes

La réponse immunitaire humorale chez les insectes peut être déclenchée par deux voies de signalisations en fonction du type de pathogène détecté par les PRR (Pattern Recognition Receptors). La voie Toll sera activée en réponse à la détection de bactéries Gram positives par des PGRP (Peptidoglycan-Recognition Protein) circulants, ou de champignons par la protéase Persephone. La voie Imd sera spécifiquement activée par la reconnaissance de peptidoglycanes de bactéries Gram négatives. Dans les deux cas, le résultat sera la synthèse de AMPs (Antimicrobial Peptides) qui seront différents selon la voie activée (ici chez la drosophile Drosomycine et Diptéricine) (Hoffmann, 2003).

sur le fonctionnement de celui-ci chez l'abeille. Ainsi, les données qui vont suivre portent intégralement sur les connaissances acquises sur le modèle drosophile.

Chez les insectes, la défense est basée exclusivement sur une réponse immunitaires innée (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Celle-ci repose sur un ensemble de réactions **cellulaires** et **humorales** qui vont permettre une réponse rapide et globale contre un large éventail d'agents pathogènes.

3.2.3.1.1. Immunité cellulaire

L'immunité cellulaire est assurée par un grand nombre de cellules circulantes de l'hémolymphes appelées hémocytes dont la fonction est d'assurer l'encapsulation, la mélanisation ou la phagocytose des particules étrangères (Wilson-Rich et al., 2009). La réponse cellulaire implique la reconnaissance de l'agent pathogène suivie de la phagocytose dans le cas d'une bactérie ou d'une cellule apoptotique, de la nodulation lorsqu'un grand nombre de plasmocytes vont s'associer afin de piéger un grand nombre de bactéries et enfin de l'encapsulation dans le cas de cibles de grande taille. Dans ce cas les plasmocytes vont se différencier en lamellocytes qui vont former une couche pluricellulaire autour du corps étranger, celui-ci sera ensuite dégradé par production de EROs ou mélanisé (Wilson-Rich et al., 2009). La mélanisation conduit à la production de quinones toxiques suite à l'oxydation de la mélanine par la phénol-oxydase (Tang, 2009).

3.2.3.1.2. Immunité humorale

L'immunité humorale est une réponse systémique qui consiste d'une part, en l'activation de cascades protéolytiques qui vont mener à la coagulation et à la mélanisation, et d'autre part, en la synthèse de peptides antimicrobiens (AMPs: antimicrobial peptides) dont l'expression est sous le contrôle des voies de régulation Toll et Imd (Hoffmann, 2003; Lemaitre and Hoffmann, 2007) (Figure 18). Ces AMPs sont produits au niveau des corps gras et seront ensuite libérés dans l'hémolymphes permettant ainsi une réponse systémique. Cette réaction est déclenchée grâce à un système permettant de différencier le soi du non-soi qui est constitué d'un ensemble de protéines de reconnaissance (PRRs) (Hoffmann, 2003). Ces PRRs sont capables de détecter des motifs moléculaires particuliers présents à la surface des microorganismes appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) (LPS, mureïne, Beta 1,3 glucane...) (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Parmi les voies de signalisation activées par ces PRRs, la voie Toll serait spécifiquement

activée par les champignons ainsi que les bactéries Gram positives, alors que la voie Imd serait plutôt activée par la reconnaissance du peptidoglycane des bactéries Gram négatives à l'aide d'un PRR particulier appelé PGRP (Peptidoglycan-Recognition Protein) (Ferrandon et al., 2007). Dans les deux cas, la cascade de signalisation conduit à la translocation du facteur de transcription NF- κ B dans le noyau. Celui-ci va induire la synthèse d'un grand nombre de gènes de l'immunité dont les AMPs en se fixant sur leurs promoteurs (Lemaitre and Hoffmann, 2007).

Dans l'intestin, où seule la voie Imd est présente, une réaction locale peut également avoir lieu avec production directe d'AMPs par l'épithélium intestinal, mais également par la production d'EROs (Charroux and Royet, 2010). De par leur forte toxicité, ces molécules vont pouvoir contrôler le microbiote intestinal. Cependant en cas de trop forte production de EROs, l'intestin peut subir des dommages comme c'est le cas dans certaines infections bactériennes (Nathan and Cunningham-Bussel, 2013).

Le séquençage du génome de l'abeille en 2006 a révélé un répertoire moins diversifié de gènes de l'immunité comparé à la drosophile (Consortium, 2006). En effet, si les voies de signalisation principales semblent être maintenues (Toll, Imd, JAK-STAT), l'abeille présente une perte de diversité génique de près de deux tiers pour ce qui est des voies de reconnaissance et des effecteurs. Ainsi, alors que 20 AMPs sont décrits chez la drosophile, l'abeille n'en posséderait que 6 (Consortium, 2006). Cette réduction pourrait être dû à la présence d'un autre niveau d'immunité : l'immunité sociale.

3.2.3.1.3. Immunité sociale

Parmi les mécanismes de l'immunité sociale, le principal est le toilettage (Evans and Spivak, 2010). Ce comportement est relativement efficace pour lutter contre *V. destructor*, cependant il pourrait également être néfaste en participant à la dissémination de certains pathogènes lorsqu'il implique les pièces buccales (Evans and Spivak, 2010). Le comportement hygiénique, qui est une réponse collective visant à éliminer et transporter les abeilles mortes hors de la ruche, permettrait de limiter l'exposition de la colonie aux pathogènes (Evans and Spivak, 2010). Le polyéthisme d'âge existant chez l'abeille (les différentes tâches sont en effet réparties en fonction de l'âge des individus) serait également une barrière aux pathogènes. En effet les butineuses, qui sont les abeilles les plus âgées, sont également les plus soumises au risque infectieux. Comme elles passent la majeure partie de leur temps à l'extérieur de la ruche, elles ont

moins de risques de transmettre un pathogène aux abeilles d'intérieur (Evans and Spivak, 2010). Un comportement de suicide altruiste par lequel les abeilles infectées seraient capables d'abandonner la ruche afin d'éviter la transmission du pathogène a été évoquée (Rueppell et al., 2010). Enfin les abeilles peuvent moduler leur température pour éliminer un pathogène, ce comportement étant qualifié de fièvre comportementale (Evans and Spivak, 2010).

3.2.3.2. Impact de la nosémosse sur la santé de l'abeille

3.2.3.2.1. Stress énergétique

Il a été montré que les abeilles infectées par *N. ceranae* semblaient présenter un stress énergétique qui s'accompagnait de changements physiologiques et comportementaux. Mayack et Naug (2009) ont ainsi été les premiers à observer une augmentation de la consommation en sucrose chez les abeilles infectées. De plus Naug et Gibbs (2009) ont montré que les abeilles infectées étaient moins enclines à partager leur nourriture par trophallaxie. Cette hypothèse de stress énergétique semble être confortée par la baisse du taux de sucre retrouvé dans l'hémolymphe (Mayack and Naug, 2010), ainsi qu'à la hausse de l'expression du gène codant l' -glucosidase au niveau intestinal suite à l'infection (Dussaubat et al., 2012), permettant de dégrader des sucres complexes en glucose. L' -glucosidase hydrolyserait ainsi le fructose pour maintenir un niveau de glucose acceptable pour pallier au stress énergétique. Cette augmentation du métabolisme énergétique suite à l'infection pourrait compenser l'ATP spoliée par le parasite. En effet *N. ceranae* présente une forte dépendance vis-à-vis de son hôte (Cornman et al., 2009; Texier et al., 2010) et doit donc récupérer directement une partie des métabolites (dont l'ATP) produits par ce dernier. *N. ceranae* est ainsi capable de recruter les mitochondries autour des foyers infectieux (Higes et al., 2007) comme cela a déjà été observé chez d'autres espèces (Hacker et al., 2014; Scanlon et al., 2004). La diminution de la concentration en acides aminés pourrait également être expliquée par un piratage des ressources de l'hôte par *N. ceranae* (Aliferis et al., 2012).

L'impact au niveau individuel d'un stress énergétique n'est pas encore bien documenté. Les abeilles utilisant exclusivement les sucres comme source d'énergie pour leur activité de vol, cette baisse de réserve pourrait entraîner une perturbation du vol de butinage, et pourrait donc expliquer le faible taux de retour à la ruche observé suite à l'infection (Kralj and Fuchs, 2009) ainsi que la baisse du nombre de vols effectués (Alaux et al., 2014).

3.2.3.2.2. Perturbation de l'homéostasie hormonale

Sous nos climats tempérés, où la durée de vie d'une abeille d'été est d'environ 6 semaines, les jeunes abeilles restent à l'intérieur de la ruche durant les 3 premières semaines après émergence afin d'assurer le rôle de nourrice et d'entretien de la ruche. Durant la troisième semaine, les ouvrières effectuent une transition du rôle de nourrice vers celui de butineuse qui va les amener à sortir de la ruche pour aller chercher du pollen et du nectar. Suivant l'âge auquel s'effectue cette transition, elles peuvent vivre encore 2 à 3 semaines supplémentaires en tant que butineuses. Afin d'assurer une cohésion au niveau de la colonie, et de s'adapter aux conditions environnementales, les ouvrières sont capables d'accélérer, de retarder voire même d'inverser cette transition afin de répondre au mieux aux besoins de la colonie (Goblirsch et al., 2013; Huang and Robinson, 1996). Ce passage d'un rôle à un autre semble être très finement régulé, entre autres, par deux hormones de l'abeille, la vitellogénine (Vg) et l'hormone juvénile (HJ) dont les niveaux d'expression sont fortement corrélés. L'hormone juvénile est capable de réprimer l'expression de la vitellogénine. Au cours de la vie de l'abeille, la production de HJ va augmenter régulièrement faisant diminuer en parallèle celle de la Vg (Amdam et al., 2003; Münch et al., 2008; Robinson and Vargo, 1997). Les jeunes abeilles présentent ainsi un taux élevé de Vg dans le corps gras ainsi qu'un faible taux de HJ alors que les butineuses présentent un faible de taux de Vg et un fort taux de HJ (Münch et al., 2008). Cette hypothèse a pu être vérifiée par le fait que l'inactivation par ARNi du gène codant pour la Vg conduit les abeilles à passer plus rapidement au stade butineuse tout en réduisant leur espérance de vie (Nelson et al., 2007). De la même façon, traiter par voie ectopique des abeilles à l'aide de HJ ou d'analogues de la HJ provoque un passage précoce au stade de butineuse.

L'infection par *N. ceranae* semble être capable de perturber cet équilibre hormonal, les abeilles infectées par *N. apis* ou *N. ceranae* présentent ainsi des taux plus élevés de HJ dans leur hémolymphe et ce taux est encore plus important en cas d'infection par *N. ceranae* (Ares et al., 2012). L'infection fait également baisser l'expression de la Vg (Antunez et al., 2009), ce qui semble en accord avec la hausse de HJ occasionnée par l'infection. Les abeilles jeunes infectées par le parasite présentent donc de forts taux de HJ et de faibles taux de Vg ce qui est l'inverse de ce qui est attendu pour des abeilles aussi jeunes. Ce déséquilibre dans la balance HJ/Vg perturberait fortement le polyéthisme des abeilles et les conduirait à passer plus tôt au stade butineuse (Goblirsch et al., 2013). En parallèle de cet effet sur le changement de rôle précoce, la

baisse du taux de Vg dans l'hémolymphe a également été reliée directement à une baisse de la durée de vie observée en laboratoire (Nelson et al., 2007). La Vg jouant également un rôle antioxydant, cette réduction de la durée de vie pourrait aussi être reliée à une moins bonne résistance au stress oxydant. L'oléate d'éthyle (OE) est une phéromone produite au niveau de la cuticule des butineuses dont le rôle est de retarder le passage du stade de nourrice vers celui de butineuse, jouant donc également un rôle important dans le contrôle de la répartition des tâches dans la colonie. Un taux d'OE anormalement élevé a pu être détecté chez de jeunes abeilles suite à l'infection par *N. ceranae* (Dussaubat et al., 2010). Cette production précoce d'OE chez les jeunes abeilles, pourrait avoir comme effet d'accélérer leur passage au stade butineuse, tout en retardant celui des abeilles plus jeunes perturbant ainsi l'homéostasie de la colonie (Dussaubat et al., 2013a)

3.2.3.2.3. Suppression de l'immunité

Afin de comprendre l'inefficacité de la réponse immunitaire de l'abeille face à l'infection par *N. ceranae*, de nombreuses études ont été menées pour étudier l'impact du parasite sur les composantes de la réponse immunitaire de l'abeille.

Au niveau de l'immunité humorale, il a été observé une perturbation de l'expression de certains peptides antimicrobiens à partir de 7 jours après l'infection (defensin, abaecin, apidaecin et hymenoptaecin) (Antunez et al., 2009; Aufauvre et al., 2014; Chaimanee et al., 2012). En parallèle, d'autres gènes impliqués dans l'immunité humorale, tels que les « sérines protéases 40 et 22 » ainsi que la glucose oxydase, sont également régulés négativement laissant supposer que le parasite est capable de bloquer la réponse immunitaire de son hôte, même si aucun mécanisme n'a été élucidé à ce jour (Aufauvre et al., 2014; Dussaubat et al., 2013b). L'expression de la phénol oxydase (PO) ne varie pas significativement suite à l'infection. L'activité de cette enzyme étant nécessaire à la mélanisation, l'immunité cellulaire ne semble pas être touchée par cet effet immunosuppresseur de *N. ceranae* (Antunez et al., 2009).

La réponse oxydante, qui est une composante essentielle de l'immunité chez l'abeille, en particulier de l'immunité intestinale, ne semble pas être inhibée par l'infection. Un certain nombre de gènes codant pour des enzymes pro oxydantes sont ainsi surexprimés suite à l'infection laissant supposer une forte décharge oxydante consécutive à l'invasion (Dussaubat et al., 2012). En parallèle, plusieurs molécules antioxydantes (catalase, peroxydase et estérase) sont

significativement surexprimées (Dussaubat et al., 2012), probablement pour contrer l'action potentiellement délétère de ce stress oxydant sur les cellules intestinales de l'abeille.

Enfin, les voies de réponse apoptotique semblent également être perturbées par le parasite (Higes et al., 2013a), ces voies sont également des composants importants de la réponse immunitaire, en particulier pour contrer les infections dues à des pathogènes intracellulaires. Cette réponse pouvant être relativement efficace pour empêcher la multiplication du parasite, il est possible que le parasite tente de bloquer l'apoptose des cellules qu'il infecte. Cela a déjà été observé dans le cadre d'infections par différentes microsporidies du genre *Encephalitozoon*, qui semblent être capables de bloquer le cycle cellulaire des cellules infectées (Scanlon et al., 2000). Ce blocage de l'apoptose pourrait être dû à la manipulation par le parasite de l'expression du facteur de transcription p53 (del Aguila et al., 2006). Cependant, les mécanismes utilisés par le parasite pour modifier la physiologie de l'abeille ne sont pas connus et méritent d'être étudiés.

4. Problématique

Dans le cadre de l'étude des interactions hôtes-parasites, les microsporidies sont, pour les raisons exposées précédemment un modèle de choix. Les impacts physiologiques des infections causées par ces parasites ont fait l'objet de nombreuses études, mais assez peu de travaux se sont penchés sur le dialogue moléculaire mis en place entre les microsporidies et leurs hôtes.

Le but premier de cette thèse a donc été de poser les premiers jalons du décryptage de ce dialogue : comment la microsporidie arrive-t-elle à se développer chez son hôte ? Comment échappe-t-elle au système immunitaire et comment parvient-elle à détourner les différentes ressources de l'hôte ?

Afin de répondre à cette question, nous avons décidé de mener une étude intégrative en travaillant du niveau cellulaire (relation cellule-pathogène) au niveau tissulaire et individuel (relation tissu-pathogène). Pour cela nous avons choisi deux modèles pour explorer ces deux niveaux d'intégration :

- *A. algerae* cultivée sur **cellules fibroblastiques humaines** (HFF) pour le **niveau cellulaire**,
- *N. ceranae* se développant dans **l'intestin moyen de l'abeille** pour le **niveau tissulaire** et individuel.

Tenant compte du peu de données disponibles dans la bibliographie sur le dialogue entre ces différents partenaires, nous avons décidé d'utiliser des méthodes exploratoires en protéomique, afin de générer des premières hypothèses pouvant ouvrir la voie à de nouvelles études plus orientées.

Dans ce cadre, mon premier objectif au cours de cette thèse a été de faire un **travail de bibliographie sur l'utilisation des méthodes protéomiques dans le décryptage du dialogue moléculaire entre un parasite et son hôte** qu'il soit animal ou végétal. Ce publication co-écrite avec Cherif Chétouni, un doctorant en biologie végétale, a fait l'objet d'une revue publiée dans le *journal Infection Genetics and Evolutions* en 2015 et sera l'objet du **chapitre III**.

Par la suite, afin de se pencher sur le **décryptage du dialogue au niveau moléculaire**, nous nous sommes penchés sur l'étude de la **réponse de cellules HFF à l'infection par la**

microsporidie *A. algerae*. Tenant compte du travail effectué dans le cadre de la revue, nous avons choisi de suivre cette réponse à l'aide d'une technique de protéomique comparative novatrice dans le domaine de la parasitologie appelée SILAC. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *PLOS ONE* et sera détaillée dans le **chapitre IV**.

L'étude de l'interaction au **niveau tissulaire** a été effectuée sur des abeilles infectées expérimentalement par *N. ceranae* pour lesquelles nous avons suivi la **réponse du protéome de l'intestin à l'aide de la méthode de protéomique différentielle en gel, la 2D-DIGE** (two-dimensional differential in gel electrophoresis). Cette étude exploratoire, publiée en 2015 dans la revue *Journal of Invertebrate Pathology*, nous a permis d'établir l'hypothèse d'un **impact de l'infection sur le renouvellement de l'épithélium intestinal de l'abeille** qui pourrait être à l'origine de la surmortalité observée chez les abeilles infectées. Ce travail sera exposé dans le **chapitre V**.

Enfin, suite à l'étude précédente, j'ai au cours de ma dernière année de thèse tenté de **vérifier cette hypothèse d'un impact de l'infection sur le renouvellement de l'épithélium intestinal de l'abeille**. Pour cela, j'ai développé un protocole de marquage en immunohistochimie qui m'a permis de suivre **l'évolution de ce renouvellement au cours d'une cinétique d'infection de 21 jours**. **L'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les voies de signalisation régulant le renouvellement a également été suivie par RT-qPCR**. Ce travail détaillé dans le **chapitre VI** a fait l'objet d'une publication qui sera soumise à PlosONE en fin d'année.

**CHAPITRE III: OUTILS "OMICS" ET APPROCHES
PROTEOMIQUES POUR DECRYPTER LE DIALOGUE
MOLECULAIRE ENTRE UN PARASITE ET SON HOTE**

L'association hôte-parasite commence lorsqu'un parasite rencontre son hôte, conduisant à un dialogue entre ces deux partenaires. Ces dernières années, les développements techniques de la protéomique ont permis de grandes avancées dans l'étude de ce dialogue entre un hôte et son parasite. Ces études ont pu mettre en évidence des stratégies moléculaires communes utilisées par les parasites, que l'hôte soit un animal ou un végétal, laissant supposer une forte convergence évolutive. De la même façon, les mécanismes qui se sont mis en place chez les hôtes afin de contrer les parasites partagent un grand nombre de similarités quel que soit le règne considéré.

Ainsi à mon arrivée dans l'équipe interaction hôte-parasite, un de mes premiers objectifs a été de réaliser une synthèse bibliographique sur les différentes stratégies moléculaires mises en place par les hôtes et les parasites intra ou extracellulaires lors de l'interaction et identifiées grâce à des approches protéomiques. Ces stratégies se révélant bien souvent communes dans le règne animal et le règne végétal, cette revue a été co-écrite en collaboration avec un doctorant de l'INRA qui a pu apporter son expertise concernant les interactions parasites-hôtes végétaux. Dans cet article, nous avons passé en revue les découvertes concernant le dialogue moléculaire entre un hôte et son parasite qui a émergé depuis 15 ans grâce aux outils protéomiques. Nous avons ainsi mis en lumière les principales protéines et voies de signalisation qui ont pu être détectées à l'aide de ces outils, aussi bien du côté de l'hôte, que du côté du parasite. En parallèle, cette revue fait également un état des lieux des différentes stratégies expérimentales de protéomique pouvant être utilisées pour décrypter le dialogue hôte-parasite ainsi que les différents écueils à éviter lors de la planification. Enfin, nous proposons pour finir, des recommandations et de nouvelles techniques de protéomique qui permettraient d'aller plus loin dans l'étude de ces interactions. Ainsi, afin de s'affranchir des protéines majoritaires il peut être intéressant d'étudier la réponse de compartiments subcellulaires ou en d'utiliser de la microdissection. Cela permet de simplifier les échantillons et donc de s'affranchir des protéines majoritaires pouvant masquer les signaux plus faibles. Enfin, les techniques de marquage métabolique tel que les SILAC (Stable Isotope Labelling by Aminoacids in Cell culture, Ong et al., 2002), même si elles sont pour l'instant limitées aux organismes modèles, permettent aussi de limiter les biais techniques inhérents aux techniques utilisées précédemment.



Review

Cross-talk in host–parasite associations: What do past and recent proteomics approaches tell us?



Chérif Chetouhi ^{a,b,1}, Johan Panek ^{a,c,d,1}, Ludovic Bonhomme ^{a,b}, Hicham ElAlaoui ^{a,c,d}, Catherine Texier ^{a,c,d}, Thierry Langin ^{a,b}, Charissa de Bekker ^e, Serge Urbach ^f, Edith Demettré ^g, Dorothée Missé ^h, Philippe Holzmüller ⁱ, David P. Hughes ^e, Andreas Zanzoni ^{j,k}, Christine Brun ^{j,k,l}, David G. Biron ^{a,c,d,*}

^a Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II (UBP), Clermont Université, 34, Avenue Carnot, BP, 63006 Clermont-Ferrand Cedex, France

^b INRA, UMR1095 Génétique Développement et Ecophysiologie des Céréales, 5 chemin Beaulieu, F-63039 Clermont-Ferrand Cedex 2, France

^c Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE), CNRS: UMR6023, Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand II, Campus des Cézeaux, 24, Avenue des Landais, BP 80026, 63 171 Aubière Cedex, France

^d Université d'Auvergne – Clermont-Ferrand 1 (UDA), Clermont Université, 49, Boulevard François-Mitterrand, CS 60032, 63001 Clermont-Ferrand Cedex 1, France

^e Department of Entomology and Department of Biology, Center for Infectious Disease Dynamics, Pennsylvania State University, University Park, State College, 16802 PA, United States

^f Functional Proteomics Platform – FPP, UMR CNRS 5203, IGF, 141 rue de la Cardonille, F-34 094 Montpellier Cedex 5, France

^g Functional Proteomics Platform – FPP, UMS CNRS 3426, IGF, 141 rue de la Cardonille, F-34 094 Montpellier Cedex 5, France

^h Laboratoire MIVEGEC, UMR CNRS 5290/IRD 224/UM, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France

ⁱ UMR 15 CIRAD-INRA CMAEE “Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes”, TA A-15/G Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^j INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, France

^k Aix-Marseille Université, UMR1090 TAGC, Marseille, France

^l CNRS, Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2014

Received in revised form 15 April 2015

Accepted 16 April 2015

Available online 22 April 2015

Keywords:

Host–parasite cross-talk

Parasitism

Parasite strategies

Host invasion

Quantitative proteomics

ABSTRACT

A cross-talk in host–parasite associations begins when a host encounters a parasite. For many host–parasite relationships, this cross-talk has been taking place for hundreds of millions of years. The co-evolution of hosts and parasites, the familiar ‘arms race’ results in fascinating adaptations. Over the years, host–parasite interactions have been studied extensively from both the host and parasitic point of view. Proteomics studies have led to new insights into host–parasite cross-talk and suggest that the molecular strategies used by parasites attacking animals and plants share many similarities. Likewise, animals and plants use several common molecular tactics to counter parasite attacks. Based on proteomics surveys undertaken since the post-genomic era, a synthesis is presented on the molecular strategies used by intra- and extracellular parasites to invade and create the needed habitat for growth inside the host, as well as strategies used by hosts to counter these parasite attacks. Pitfalls in deciphering host–parasite cross-talk are also discussed. To conclude, helpful advice is given with regard to new directions that are needed to discover the generic and specific molecular strategies used by the host against parasite invasion as well as by the parasite to invade, survive, and grow inside their hosts, and to finally discover parasitic molecular signatures associated with their development.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: 2DE, two-dimensional gel electrophoresis; APAF1, apoptotic protease-activating factor 1; CDWE, cell wall-degrading enzymes; CED4, cell death protein 4; ChIP seq, chromatin immunoprecipitation-sequencing; ColP, co-immunoprecipitation; DIGE, fluorescence difference gel electrophoresis; HPRR, host pattern recognition receptors; HR, hypersensitive response; ICAT, isotope-coded affinity tag; iTRAQ, isobaric tag for relative and absolute quantitation; LRR, leucine-rich repeat; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MS, mass spectrometry; NBS, nucleotide-binding site; NIR, NOD-like receptors; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PR, pathogen-related; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; SILAC, stable isotope labeling with amino acids in cell culture; TIR, Toll/interleukin-1 receptor; TLR, Toll like receptor; T3SS, type three secretion system; Y2H, yeast two hybrid.

* Corresponding author at: Laboratoire “Microorganismes: Génome et Environnement”, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 24 Avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. Tel.: +33 (0)4 73 40 74 58; fax: +33 (0)4 73 40 76 70.

E-mail addresses: david.biron1@univ-bpclermont.fr, dg.biron@hotmail.com (D.G. Biron).

¹ These authors contributed equally to the writing of this review.

Contents

1. Introduction	85
2. Similar cross-talk regardless of the kingdom of the host	85
2.1. Parasite molecular strategies to invade and establish in host cells	85
2.2. Host molecular strategies to counter parasite infection	87
2.3. Non-immunological host defense	88
3. Contribution of proteomics tools	89
4. Pitfalls in cross-talk deciphering	90
5. Guidelines to collect new key datasets	91
6. Concluding remarks	92
Acknowledgements	92
References	92

1. Introduction

Much of life on earth is parasitic and involves organisms from one domain of life exploiting another. To have access to the nutrients needed for their growth and their survival, parasites are required to reach an appropriate cellular niche (i.e. habitat) to create “metabolic modification zones” in one or more host compartments. Examples of such niches include parasitophorous vacuoles for *Leishmania* sp. in mammalian target cells, or mammalian blood and lymphoid organs for *Trypanosoma* sp., and plant tumors induced by parasites including fungi, bacteria, nematodes, mites (small arthropods belonging to subclass Acari (also known as Acarina) and the class Arachnida), and insects (Agrios, 1997; Beyer et al., 2002; Rohfritsch, 2008). This parasite niche view implies that chemical changes, which occur dynamically over short periods of time due to host or parasite activity, are typical of the host–parasite interactions. For many host–parasite associations, this arms race has been in progress for several hundred millions of years (Schmid-Hempel, 2011). This has led to the selection of three parasitic cellular lifestyles: (i) extracellular, (ii) obligate and (iii) facultative intracellular. Crucial to a parasite's success are the evolved strategies to bypass host defenses, and/or allow the hijacking of host cellular functions (Elde and Malik, 2009). This raises the question whether there is a common ancient origin of the proximate mechanisms used by parasites to hijack host cellular functions. On the other hand, animal and plant defenses, acquired during the cross-talk against microbial and eukaryote parasite species since billions of years, could be the result of both divergent and/or convergent evolution.

In this review, we highlight and summarize molecular and evolutionary discoveries on host–parasite cross-talk in plant and animal kingdoms, made over the past 15 years. For instance, present scientific knowledge shows that part of the molecular mechanisms that allow plants and animals to counter microbial and eukaryote parasite infections exhibit impressive structural and strategic similarities (see Table 1 and Fig. 1). We highlight the proteins and biochemical pathways that have been detected by past and recent proteomics studies during those cross-talks between hosts (i.e. animal and plant kingdoms) and their parasites (from viruses to uni- and multi-cellular organisms). We also present several proteomics tools and strategies to study host–parasite cross-talk. Moreover, we discuss the pitfalls in these proteomics surveys. Finally, we argue for new avenues of research to reveal the molecular dialogue in both animal- and plant host–parasite associations. This will aid in the discovery of the general and specific molecular strategies used by the host against parasites, the parasitic strategies for invasion, survival, and growth in host tissues, and ultimately, the unraveling of parasite molecular signatures associated with parasite development in the host.

2. Similar cross-talk regardless of the kingdom of the host

Life began on our planet more than 3.5 billion years ago, and evolving single-cell organisms, archaea, bacteria and eukaryotes, have flourished ever since. About 600 million years ago, metazoans began to form, and this new species development in the Tree of Life was followed by a remarkable diversification of metazoan species. Where and when did the first host–parasite cross-talk occur during the divergent evolution in the three domains of life: Archaea, Bacteria and Eukaryota? The first species opting for a parasitic lifestyle probably originated from aquatic systems (e.g. viruses infecting Archaea and Bacteria) since a large part of the ancestral living organisms evolved in the ocean for thousand millions of years (Emilianowicz, 1952). Furthermore, over half of life on earth is parasitic and, as a life history strategy, parasitism has evolved more times than predation (Lafferty et al., 2006). A large part of the living organisms, at different times during the evolution of life and in each kingdom, have opted for and/or were under duress to invade other organisms. This invasion could be both within and across kingdoms as well as at the extra- and intra-cellular level. Next to that, parasitism has favored host speciation and the development of new host biological functions via an arms race that has been ongoing for several hundred million years (Karvonen and Seehausen, 2012; Schmid-Hempel, 2011).

Parasitic species have acquired tools through the selective pressure to bypass the host's defenses to win the molecular war and promote their life cycle. Many strategies to defeat host defense mechanisms were developed and selected: production of toxins and parasite effectors, adherence to host cell surfaces or to the extracellular matrix, invasion of host cells, evasion of adaptive immunity based upon antigenic variation, multiple types of secretion mechanisms (Type I, II, III and IV) that inject virulence factors into host cells, tight regulation of virulence factor production, iron sequestration, and host mimicry (Dean, 2011; Zhang et al., 2005). On the other hand, host species like plants and animals have acquired efficient molecular tools and immune mechanisms to discriminate between self and non-self, to recognize a diverse array of pathogen molecules expressed during the molecular cross-talk, to counter parasite invasion, and to kill or tolerate invading pathogens (Burnet, 1961). Here, we will summarize parasite (see Section 2.1) and host (see Section 2.2) molecular strategies shaped through host–parasite co-evolution in plant and animal kingdoms for many hundred million years.

2.1. Parasite molecular strategies to invade and establish in host cells

Parasitic microorganisms and parasitic eukaryotes are notably characterized by specific arrangements of key molecules called microbial- or pathogen-associated molecular patterns (MAMPs or

Table 1

Similarities and differences in molecular strategies used by plants, and animals (invertebrates and vertebrates) to counter parasite invasions.

Taxonomic group	Innate immunity (nonspecific)			Adaptive immunity (specific)		
	Ancient (plants, insects, vertebrates)/Billions of years old, Perfect self–nonself discrimination, Recognition: PAMPs, Time to onset: Immediate; Memory: No			Modern (jawed vertebrates)/400 million years old, Imperfect self–nonself discrimination (ex.: allergy), Recognition: Specific structure of parasite molecules, Time to onset: Delayed; Memory: Yes		
	Immune mechanisms					
	Recognition receptors	Antimicrobial peptides	Phagocytose	Antibodies	Lymphocyte cells	Protective enzymes induced by the infection
<i>Plants</i>	(+)	(+)	(–)	(–)	(–)	(+)
<i>Invertebrates</i>						
<i>Prorifera</i> (sponges)	(+)	(+)	(+)	(–)	(–)	?
<i>Annelids</i> (earthworms)	(+)	(+)	(+)	(–)	(–)	?
<i>Arthropods</i> (insects)	(+)	(+)	(+)	(–)	(–)	(+)
<i>Vertebrates</i>						
<i>Fish</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Amphibia</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Reptiles</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Birds</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
<i>Mammals</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(+) Present.

(–) Absent.

(?) Not identified.

PAMPs), such as flagellin6. MAMPs and PAMPs include, for instance, lipopolysaccharide (LPS), lipoproteins, peptidoglycan, lipoarabinomannan, oligosaccharides eubacterial flagellin and unmethylated bacterial DNA fragments (Aderem and Ulevitch, 2000; DeYoung and Innes, 2006; Girardin et al., 2002; Medzhitov and Janeway, 2002). MAMPs and PAMPs are vital structures of parasite species that have altered little over evolutionary time-spans. These molecules have distinct nucleic acid motifs that are unique to parasite species (Aderem and Ulevitch, 2000; Medzhitov and Janeway, 2002; Teixeira et al., 2002). Moreover, unifying features of MAMPs and PAMPs are their highly conserved structures, their functional importance for and their presence in various parasite species, and their absence in cells of potential host organisms (McGuinness et al., 2003; Teixeira et al., 2002; Underhill and Ozinsky, 2002). The high conservation of sequences and molecular structure of MAMPs and PAMPs could be explained by the functional similarity of host molecules that recognize parasite molecules. For instance, MAMPs and PAMPs are recognized by host pattern recognition receptors (HPRRs). These HPRRs are expressed on both the surface (e.g. Toll-like receptor (TLR) in animals and receptor kinases in plants) and the cytoplasm of host cells (e.g. nucleotide-binding oligomerization domain (Nod-like) receptors in animals, and nucleotide-binding site and leucine-rich repeat (NBS-LRR) domains of plant receptors) (Fig. 1).

The most common mechanisms shared by extra- and intra-cellular parasites at the beginning of the infection process of an animal or a plant are the strategies to recognize and adhere to host cells. An example is the protein OmpA of *Dickeya dadantii* (ex-*Erwinia chrysanthemi*), an extracellular parasite of plants that causes soft rot. The OmpA protein is involved in the recognition and adhesion process to plant cells (Babujee et al., 2007). A second key step for extra- and intra-cellular parasites is the secretion of molecules including proteins and peptides (ex.: MAMPs, PAMPs) to favor the invasion of host cells. Parasites will secrete effective molecules (i.e. effectors) or toxins in the extracellular environment or in the cytoplasm of host cells to promote a compatible interaction with the host. This will allow the development and multiplication of extra-cellular parasites or the penetration of intra-cellular parasites in the host cell after the degradation of the cell walls by using cell wall-degrading enzymes (CWDEs) (Mehta et al., 2008a; Zhang et al., 2005) or after a receptor-assisted entry to

create a parasitophorous vesicle (e.g. *Leishmania*) (Antoine et al., 1998) (Fig. 1). Many studies have been performed to study the CWDEs used by parasites attacking animals since they are relatively easy to obtain and correspond to economic interests.

For parasites attacking plants, the CWDEs are generally secreted during short periods of time in small quantities. This results in the necessity to follow the kinetics of infection in many host samples during a short period of infection to be able to extract enough proteins to detect the effectors. A study of the exoproteome of a water mold, *Phytophthora ramorum*, has demonstrated that it produces CWDEs (namely six putative mucins, five putative glycoside hydrolases, two transglutaminases, one annexin-like protein and one Kazal-type protease inhibitor) to invade oak cells (Meijer et al., 2006). For the enteroparasite, *Escherichia coli*, a shotgun study on its secreted proteins detected seven effective proteins known to be carried by the T3SS (Type III secretion system) including the Tir protein that induces the development of actin pedestals in infected host cells (Roe et al., 2007). Actin pedestals are formed in host infected cells, which push the host membrane to lengths up to 10 µm away from the host cell surface. The role of pedestals in pathogenesis is not completely understood. To ensure their need to find nutrients (e.g. amino acids, sugar, and metabolites) without being detected by the host immune system, parasites use antigenic variation or mimicry strategies (Higgins and Carrington, 2014). Furthermore, they have to control the cellular cycle of their hosts (e.g. root-knot nematodes) and, in the case of intracellular parasites, the cellular traffic (Hewezi and Baum, 2013).

Parasite virulence is defined as the damage done to the host during host–parasite interaction, and can be measured, for example, as premature host death or decreased fecundity. Parasite virulence is a key pressure in the arms race taking place since several hundred millions of years in host–parasite associations. Therefore, as a response to parasite virulence, the immune system of the phylum vertebrata has evolved to express nonspecific immune strategies (innate immunity) and specific immune strategies (adaptive immunity) to counter invasion and infection by uni- and multi-cellular parasite species. The birth of the adaptive immune system is believed to have occurred when an Ig superfamily (IgSF) gene of the variable (V) type was invaded by a transposable element containing RAG1 and RAG2 genes (Fugmann, 2010).

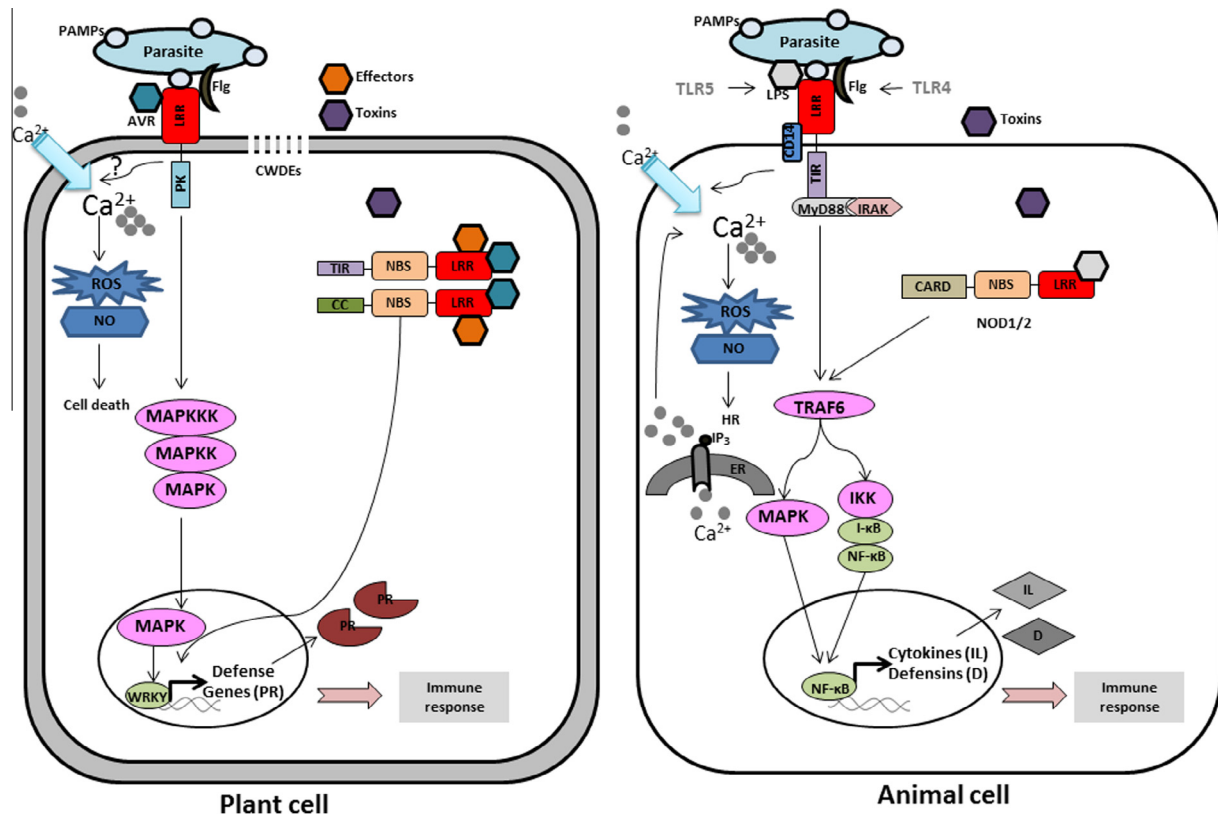


Fig. 1. The current known cross-talk taking place when parasites invade and establish in animal or in plant cells. leucine rich repeat (LRR) associated to protein kinase (PK) in plants and LRR-TIR (TLR 4 and TLR 5) in animals are examples of the transmembrane receptors for the recognition of the pathogen associated molecular patterns (PAMPs), lipopolysaccharides (LPS), flagellin (Flg), effectors or avirulence (Avr) signals. In animals, the recognition of LPS, the complex combined LRR proteins, CD14 and TLR4 (containing TIR cytoplasmic domain) is formed. TLR5 is involved for flagellin recognition. Subsequently, TLRs interact via adapter proteins like (MyD88 (myeloid differentiation factor) or with the serine/threonine kinases IRAK that share homology with the kinase domains of receptor-like kinases from plants. A series of protein kinases, including mitogen-activated protein kinases (MAPKs) mediate activation of transcription factors (NF-κB) and the transcription of genes encoded proteins involved in immune response such as Interleukin (IL) and defensin (D). In plants, several LRR proteins present similarity with animal receptors (CD14 and TLR) are involved in parasite defense activation. Avirulence (Avr) proteins are recognized by LRR proteins with a high-affinity binding site which activates the MAPK. In addition, the translocation of PAMPs-activated plant MAPKs into nucleus has been showed. In the nucleus, these MAPKs activate the Wrky transcription factors which induce gene expression of pathogenesis related proteins (PR). Intracellular recognition of LPS in animals is mediated by the NBS-LRR receptors NOD1/2 while intracellular recognition in plants has not been observed. In plants, intracellular R genes (TIR-NBS-LRR or CC-NBS-LRR) recognized Avr proteins which confer pathogen race/plant cultivar-specific immunity to several parasites (virus, bacteria, oomycetes and fungal). Parasite recognition induces changes in calcium level (Ca^{2+}) in the cytoplasm. This calcium is involved in transduction signal, in the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric acids (NO). In plants, the elevated cytoplasmic level of Ca^{2+} is due to influx of calcium from extracellular space. However, in animals this calcium is mostly due to inositol-3-phosphate (IP_3) receptor mediated release of calcium from endoplasmic reticulum (ER) internal stores. ROS/NO are essential factors for the activation of innate immune response in animals by cell death induction and by hypersensitive reaction (HR) in plants.

2.2. Host molecular strategies to counter parasite infection

One of the main threats for living organisms in the biosphere is the invasion and infection by a parasite. Therefore, the availability of an efficient immune system (i.e. afferent (sensing) and efferent (effectors) molecular mechanisms), which permits recognition and killing of the invading parasite, is of high adaptive value. Not surprisingly, the immune system of almost all uni- and multi-cellular organism is extremely complex. The most impressive example is found in higher vertebrates (ex.: mammals). Here, the immune defense consists of two main parts: an innate immediate response and an adaptive response that is delayed but highly specific and long lasting (Boehm, 2012; Charley et al., 2006; Lepargneur and Abbal, 2012). All living organisms except vertebrates (i.e. unicellular, invertebrates, plants, and fungi) rely exclusively on innate immunity to counter parasite invasion and infection. Interestingly, many features of the innate system are highly similar among these living organisms, suggesting that they have a common origin and have subsequently been conserved.

At the beginning of the attack by extra- or intra-cellular parasites, the first essential step for animals or plants is the detection of parasite molecules (ex.: MAMPs, PAMPs) via its HPPRs (host

pattern recognition receptors) on both the surface and in the cytoplasm. Animal TLRs (Toll-like receptors) and RLKs (plant receptors like kinases) used to detect MAMPs and PAMPs are similar in overall structure in that all are transmembrane receptors that have C-terminal LRRs (leucine-rich repeat domains). However, the cytoplasmic domains (i.e. adapters) are not conserved: TIR (Toll/Interleukin-1 receptor/resistance motif) domain for animals and Kinase domain for plants (see Fig. 1). TIR domain is an ancient protein fold that has been associated with disease resistance since a time before the divergence of plants and animals. A total of five cytoplasmic adapter proteins are presently known to be available in mammals to carry signals from the TLRs into the cytoplasm: MyD88, MAL (or Tirap), TRIF (or Ticam-1), MyD88-4, and MyD88-5. After many hundred millions of arms race between hosts and parasites, the same biochemical modules (LRR) coupled with a proteinic intracellular domain were selected for recognition of MAMPs and PAMPs in the animal and plant kingdoms. The absence of sequence similarity of LRR modules might further suggest that both proteins arose independently as a result of convergent evolution. This hypothesis is corroborated by the fact that both receptors apparently recognize different structures of flagellin (Donnelly and Steiner, 2002; Felix et al., 1999).

A structural (but not conceptual) difference between FLS2 and TLR5 concerns the intracellular-signaling domain of the receptor proteins (Fig. 1). FLS2 harbors a cytoplasmic kinase domain, of which phosphorylating activity is crucial to flagellin sensitivity (Gómez-Gómez and Boller, 2000; Gómez-Gómez et al., 2001), while TLR5 carries an intracellular TIR domain that is indirectly associated with the IL-1-receptor-associated kinase (IRAK) via the adapter protein MyD88 (Fig. 1). Moreover, plants have a family of RLKs. Although the overall structure of the RLKs signaling pathway seems similar to that of the HPRR signaling pathways in animals, there is no conservation of any individual components and the similarity most likely reflects the ubiquity of eukaryotic MAPK (mitogen-associated protein kinase) stress-responses to environmental signals.

When parasite effectors are released in the host cytoplasm, host intracellular receptors must act to counter the parasite invasion. Plant NBS-LRR proteins confer resistance to diverse parasites, including fungi, oomycetes, bacteria, viruses and insects (DeYoung and Innes, 2006). NBS and LRR domains are also present in NOD-like immunoreceptors (NLRs), which are involved in PAMPs' induction of innate immunity responses in animals, and in the animal apoptotic protease-activating factor 1 (APAF1) and cell death protein 4 (CED4). Many plant NBS-LRR proteins also contain an N-terminal TIR (Toll, interleukin-1 receptor, resistance protein) domain related to the intracellular signaling domain of animal Toll-like receptors. The presence of TIR domains in conifers and mosses indicate that TIR may represent an ancestral resistance gene family with shared functionality with their mammalian and insect homologs with regard to innate immunity (Girardin et al., 2002; Meyers et al., 1999). Although the presence of the TIR domain in some NBS-LRR plant disease-resistance proteins suggests a common evolutionary origin of plant and animal PRRs, the downstream signaling pathways have nothing in common. The overall conservation of the tripartite structure of animal CLR and plant NBS-LRR proteins also suggests evolutionary conservation, but these proteins are not present in invertebrates, suggesting independent evolutionary origins in plants and animals.

After the recognition of attack by the parasite(s), the host needs to set a group of response mechanisms in motion especially via the innate or adaptive immune systems (Fig. 1). For instance, the plant basal defense, which is the first defense response, triggers a generic mechanism consisting of plant cell wall thickening, papilla deposition, apoplast acidification, signal transduction and transcription of defense genes (Dangl and Jones, 2001). Superimposed on the basal defense, some plant varieties express a hypersensitive response (HR) to parasite(s) and subsequent programmed cell death. The function of the HR is to contain parasite(s), and it is typified by various biochemical perturbations such as changes in ion fluxes, lipid hyperperoxidation, protein phosphorylation, nitric oxide generation and a burst of reactive oxygen species and antimicrobial compounds. Plant cells produce key pathogen-related (PR) proteins involved in the basal immune defense. To date, 17 PR protein families are known. These defense proteins show a diversity of biological activity (e.g. anti-fungal for PR1, protease inhibitor for PR2) and multiple sites of action (e.g. fungal cell wall for PR2, PR3 and PR4; cell membrane for PR5). Animal and plant cells also use non-specific defense mechanisms against parasite infections, such as reactive oxygen and nitrogen species (ROS-RNS), and other redox active molecules (Table 1 and Fig. 1).

Furthermore, one topic that has received a lot of attention is MAPK signaling. MAPK pathways are ubiquitous signal transduction components in eukaryotes that are activated by diverse stimuli such as growth factors, cytokines, neurotransmitters and various cellular stresses, and transfer signals from extracellular receptors to cellular responses (Dóczi et al., 2012). A MAPK cascade typically consists of a modular complex consisting of a MAPK

kinase kinase (MAPKKK), which phosphorylates a MAPK kinase (MAPKK), which phosphorylates a MAPK (Pitzschke et al., 2009). These pathways regulate the activity of various substrates, such as transcription factors and protein kinases, and have been demonstrated in the nematode model *Caenorhabditis elegans* to constitute a functional pathway in an intestinal innate immunity system that protects worms from pathogen infection (Sakaguchi et al., 2004).

After around three decades of proteomics surveys on deciphering of cross-talk in host–parasite associations, actual knowledge strongly suggest that plant and animal hosts use similar strategies and biochemical pathways to counter parasite attacks (Biron et al., 2011; Keen et al., 2000; Mehta et al., 2008a; Zhang et al., 2005). Thus, although the overall structure of parasite-associated molecule signaling pathways in plants and animals is similar (see Fig. 1) in that both involve (i) transmembrane LRR receptors, (ii) MAPK mitogen-associated protein kinase (MAPK) signaling cascades, (iii) production of active oxygen and nitrogen species, (iv) calcium fluxes, (v) activation of transcription factors and (vi) the inducible expression of immune effectors, there is no proof that this similarity reflects evolutionary conservation of an ancient host signaling pathway strategy to counter parasite invasion and infection. Indeed, this apparent evolutionary conservation seems to be equally well explained as being a reflection of the overall conservation of the components of canonical MAPK signaling cascades that form a bridge between diverse signal sensors and/or receptors and target genes in eukaryotes (Ausubel, 2005; Jones and Dangl, 2006; Nürnberger et al., 2004). These MAPK signaling pathways are present in plants, invertebrates and vertebrates, and presumably appeared early during the divergent evolution of ancestral unicellular species (i.e. before the emergence of metazoans) (Ausubel, 2005; Jones and Dangl, 2006; Nürnberger et al., 2004).

Significant differences remain between molecular mechanisms and strategies used by plants and animals for the nonself recognition and for the killing of nonself. For example, specialized cell types (macrophages, neutrophils, and dendritic cells), which as parts of a circulatory blood system are the key players of the animal immune system, are not found in plants (Jones and Dangl, 2006; Nürnberger and Brunner, 2002). Moreover, vertebrates have specialized cells issued from the adaptive immune system: B and T lymphocytes. These adaptive cells have B and T lymphocyte receptors respectively, which are clonal and rearranged during development following somatic recombinations, and they are involved in immunological memory.

2.3. Non-immunological host defense

Arms races in host–parasite associations have favored intensive cross-talk between organisms resulting in the selection of host defense mechanisms. One important host defense in the animal kingdom against parasites is the immune system. However, there are also several mechanisms of defense that have evolved in invertebrates about one hundred million years ago. These invertebrate defense mechanisms fall outside of what is traditionally considered to be the immune system. These non-immunological defenses are for instance selected host behaviors: (i) behavioral thermoregulation, (ii) behavioral avoidance, (iii) self-medication, (iv) anorexia, and (v) social immune mechanisms (Parker et al., 2011). To our knowledge, no studies were done to decipher cross-talks involved in these non-immunological defenses. These studies could help to identify new host and parasite molecules as well as biochemical pathways involved in the dynamic host–parasite interactions when a parasite tries to invade, infect, and establish in an invertebrate species. Moreover, these types of studies could be done for many vertebrate species, including humans. Furthermore, the deciphering of the cross-talk involved in host cell death programs (apoptosis or necrosis) used by animals and plants to counter

parasite invasion and infection is another interesting research avenue to improve our understanding of the dynamics of host–parasite interactions, as well as to discover new molecules and new biochemical – and signaling pathways involved in the arms race between a host and a parasite.

3. Contribution of proteomics tools

The genome represents the first step in the complexity of biological functions involved in any molecular cross-talk between host and parasites. Transcriptomic studies using RNAseq and microarrays methods have been conducted to provide the foundation of understanding the host–parasite molecular cross-talk (Mei et al., 2014; Pombo et al., 2014; Rudd et al., 2015). Although transcriptomics allows an exhaustive view of gene regulations that can specifically respond to a parasitic infection (virus, bacteria, fungi, etc.), it does not provide a full understanding of the whole range of cellular regulations. Firstly because gene expression is widely regulated post transcriptionally and also because proteins which are responsible for the cell biological functions are expressed in a highly dynamic process and are interacting with high specificity (Dhingra et al., 2005). Understanding protein abundance changes, their interactions and their localizations is thus of particular interest and a promising way to go further in deciphering host–parasite interactions. Proteomics includes the systematic study of all the proteins expressed by a genome in cells or tissues upon specific physiological states (Coiras et al., 2008). Currently, proteomics has established as an indispensable technology to interpret the genomic information and has been successfully applied in protein identification, protein quantification, post translational modifications (PTMs) and protein interactions (Fig. 2) (Aebersold and Mann, 2003). The knowledge about host–parasite interaction has evolved over the time as the proteomic methods and techniques have improved. In most proteomics studies, using both old and recent tools, many similar host proteins were found to be differentially produced during the parasite infection. These proteins are involved in many biochemical pathways to detect, to prevent, and to counter parasite attacks. For instance, several proteins involved in immune defenses are similar in animal and plant kingdoms.

In plants, the molecular cross-talk between host and pathogen in the compatible (disease development after infection) and incompatible (no disease after infection) interactions implicate hundreds of proteins involved both in the early and the late stages of the interaction. Thus, several pathogenesis related proteins (PR) such as chitinases, glucanases, thaumatin like protein, GST, peroxidase, heat shock proteins (HSP) were profiled from the early proteomic experiments interesting to plant/fungi (Kim et al., 2003; Rep et al., 2002), plant/bacteria (Jones et al., 2004; Wan et al., 2005), plant/nematode (Mehta et al., 2008b) and plants/Oomycete (Colditz et al., 2004) interactions by using the in gel-based quantification approaches (Fig. 2). These proteins are highly expressed or induced upon pathogen infection and easily detectable by the gel-based approaches. In animals, several proteins related to immune responses such as proteases and protease inhibitors were identified in *Drosophila* (Levy et al., 2004; Verleyen et al., 2006). Macroglobulin, transglutaminase cyclophilin, and vinculin were identified in hemocyte cells after bacterial infection (Herbinière et al., 2008) as well as the appearance of an interleukin-2 in response to nematode infection in mouse (Pemberton et al., 2004). A proteomics study on the hemolymph of *Drosophila* larvae treated with lysis cells of many pathogenic bacteria (*Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, and *Streptococcus pyogenes*) revealed an induction of proteins

involved in the detoxification of host cells including increasing amount of thioredoxin peroxidase 1 and 3, glutathione transferase and thioredoxin reductase (de Moraes Guedes et al., 2005). Considering the few amounts of parasite proteins in the host tissues, most proteomics studies have focused on unraveling changes in the host proteome. However, some pivotal pathogen proteins were identified including the flagellin of the *Burkholderia cenocepacia* bacteria increasing during murine infection when the alkyl hydroperoxide reductase subunit C protein disappears (Chung and Speert, 2007). Some constitutive and highly abundant proteins of the pathogens (actin, tubulin, ribosomal proteins) have also been detected as a way to confirm the presence of the pathogen, especially when symptoms are lacking (during the early stages of the molecular dialogue for instance), but in any case they do not provide sufficient information to understand the infectious strategies implemented by parasites (searching for effectors proteins). Deciphering pathogen proteomic adjustments usually requires the isolation of the pathogen before any proteomics approach.

Searching to improve the access to the parasite proteins has been a challenge for studying a number of host–parasite interactions. Successful developments have allowed the identification of different proteins involved in primary and secondary metabolisms and putatively connected to the infectious processes. These proteins displaying usually enzymatic activity, were mostly localized in the cytoplasm and harbored chemical properties that are compatible with further proteomics analyses. Unfortunately, scarce proteins with fundamental roles in the cell regulations such as transcription factors and protein kinases are poorly identified using in-gel quantification approaches. Most of the time, they represent a very small proportion of the whole set of detectable proteins and are submitted to slight changes that do not fit with such proteomics approaches. Improved methods were then developed to increase the sensitivity and to identify such low abundant proteins (e.g. 2D-DIGE; Ünlü et al., 1997; Coiras et al., 2008). This opened new avenues in the identification of several compounds involved in signaling pathways (MAPK, transcription factors such as Wrky and NAC, hormones components such as ABA-related pathways and auxin-related pathways, etc.) (Amey et al., 2008; Schenkluhn et al., 2010).

In addition, many small proteins involved in plants/pathogens cross-talk such as inhibitors of xylanases (Dornez et al., 2010) and cytoplasmic receptors (LRR-NBS) (Yao et al., 2012) were identified from such 2D-DIGE analyses. In animals, several components involved in the gene remodeling were also identified upon pathogen infection. The transcription NF- κ B involved in the regulation of apoptosis as well as in innate and adaptive immunity responses were highlighted by such methods (Niederberger and Geisslinger, 2013). Although gel-based quantification methods have substantially increased our knowledge of the molecular determinism of host–parasite interaction, many technical limitations have made the development of quantitative mass spectrometry a new way to dig into the molecular determinism of host–parasite interactions. Mass spectrometry has become a promising strategy in the quantitative proteomics toolbox (Otto et al., 2014). At present only few studies on host–parasite cross-talk have adopted label-free approaches (Dreisbach et al., 2011). The recent metaproteomics approach, developed thanks to improvements in protein and peptide separation efficiencies and mass spectrometry, offers the possibility to study the collective proteome of the host and the pathogen (Gunnaiyah et al., 2012), and of the microbial communities to further improve the understanding of the microbes' dynamics inside and around their potential hosts (Kolmeder and de Vos, 2014). Techniques using the labeling of the host or the pathogen proteins before inoculation in order to follow the host–parasite cross-talk have been developed (e.g. SILAC method) in viruses/mammalian interactions (Barrero et al., 2013;

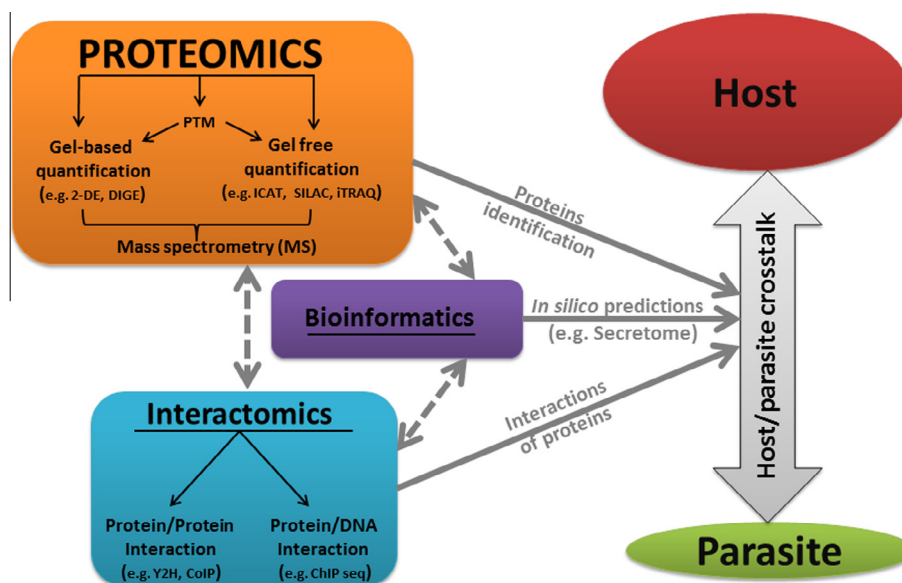


Fig. 2. Schematic representation of the principal workflows used in proteomics and interactomics for host–parasite cross-talk deciphering. The proteomics approaches concern protein identification, differential analysis, protein quantification by using the gel-based quantification methods (e.g. 2D, DIGE) and gel free methods (e.g. SILAC, iTRAQ) and post translational modifications (PTM). Interactomics concern the study of protein–protein interaction (e.g. Y2H, CoIP), protein–DNA interaction (ChIP) and protein/small molecules interaction. Bioinformatics tools are used for Omics data mining and *in silico* predictions (e.g. PTM, secretome, interactome).

Berard et al., 2012) and in the case of human-parasitic fungus interactions (Reales-Calderón et al., 2013). Three available label combinations can be used to compare up to 3 treatments in a single MS/MS analysis. This is the most common experimental design for a SILAC experiment, but variations in the amino acids used can permit comparison of more samples (e.g. 5 treatments) (Molina et al., 2009).

Currently, only few SILAC studies have focused on eukaryotic parasites (e.g. trypanosomatids), but they have proven their relevance in assessing the dynamic of the *Trypanosoma brucei* proteome during the parasite life cycle (i.e. between the bloodstream stage in the mammalian host and the procyclic stage in the tsetse fly) (Urbaniak et al., 2012) as well as in exploring the molecular mechanisms underlying drug resistance in *Leishmania* (Brotherton et al., 2013) and human fibroblast cells response to *Anncalia algerae* (Panek et al., 2014). Other MS-based quantitative approaches were developed to study the molecular cross-talk *in vitro* (Cultured cells and parasite) (iTRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantification). One advantage of iTRAQ compared to SILAC is that it can be used on any type of cells or tissues since it does not rely on *in vivo* isotope incorporation (Hughes and Krijgsveld, 2012). The use of these labeling methods to decipher host–parasite interactions has resulted in new ways to improve the diagnosis and control of important zoonoses. For instance, the use of iTRAQ technology allowed for the detection of specific biomarkers for *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) and *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne's disease in cattle and Crohn's disease in humans) (Lamont et al., 2014). With the same methodology, Cui et al. (2013) provided valuable data on the molecular mechanisms defining host–*Echinococcus granulosus* interactions. This increased the potential for characterizing new therapeutic targets and vaccine candidates and will speed up the development of protein probes for selective and accurate diagnosis of hydatid disease (Cui et al., 2013). In the case of *Campylobacter jejuni*, the predominant agent causing sheep abortion and human gastroenteritis, proteomics analysis of immunodominant antigens provided a new basis for vaccine development (Wu et al., 2014). The iTRAQ method was also used in plants to measure the proteomic changes between a resistant genotype and susceptible

genotype of tomato at different time points after *Pseudomonas syringae* (bacteria) infection. Among 2369 proteins, identified, 447 demonstrated significant changes in expression following pathogen inoculation (Parker et al., 2013).

Another level of regulations between the host and the pathogen concerns the post-translational modifications (PTM) (phosphorylation, glycosylation, acetylation and ubiquitination, sulfation, sumoylation) (Fig. 2). These modifications play an important role in the control of the activity, localization and stability of proteins, and their interactions with other macromolecules (Gstaiger and Aebersold, 2009). Functional genomics and transcriptome analysis cannot provide experimental evidence for protein modifications other than protein sequence information for the *in silico* prediction of candidate sites of modification (Gstaiger and Aebersold, 2009). PTM of proteins can occur very rapidly after infection. The treatment of cells by microbes elicitors induced phosphorylation changes (Dietrich et al., 1990; Felix et al., 1991; Lecourieux-Ouaked et al., 2000; Viard et al., 1994). Most of these proteins differentially phosphorylated are proteins involved in the signal transduction pathways (e.g. LRR-containing proteins, MAP kinase and transcription factors). During this last decade, several PTM of hosts or pathogens proteins were identified using mass spectrometry tools. In host/bacteria interactions, the bacteria can affect the phosphoproteome either directly through the action of bacterial effectors, and/or indirectly through downstream effects of host proteins modified by the effectors (Grishin et al., 2015; Rayapuram et al., 2014). In the *Magnaporthe oryzae*/rice pathosystem, phosphoproteome analysis revealed 53 phosphoproteins belonging to 12 functional categories in resistant or susceptible background (Li et al., 2015). The changes in the plasma membrane protein phosphorylation were investigated in *Arabidopsis* cells after their treatment with the bacterial elicitor flagellin. Two phosphorylation sites that are strongly induced after the treatment seem required for NADPH oxidase activation (Nühse et al., 2007).

4. Pitfalls in cross-talk deciphering

Many cell biologists, microbiologists, and parasitologists used proteomics surveys as a mean to explain cross-talk in

host–parasite associations. Early “parasito-proteomics” studies have provided a wealth of information about the cross-talk during the attack of a host by a parasite and the hijacking of its cellular functions (Biron et al., 2005). Unfortunately, to date, due to very low dynamic ranges, most of these proteomics data reveal only the host response to parasitism, i.e. host molecules and host biochemical pathways involved in host–parasite cross-talk (Biron et al., 2013, 2011; Mehta et al., 2008a; Patramool et al., 2012). Consequently, proteomics studies and related tools so far have not revealed the complete host/parasite (i.e. proteins, peptides, and metabolites) expressed during the invasion of host compartments (i.e. cells and tissues) and the hijacking of host cellular functions that ensure parasite growth to increase the likelihood of completing its life cycle. In many associations, the main difficulty is the organism size. Since parasites are often smaller than their hosts it can be difficult to obtain enough parasite-derived proteins that make possible their detection and profiling during host–parasite cross-talk. However, thanks to the improved methodologies, massive amount of data have been produced. Today, their interpretation turns into a labor-intensive job. All identified proteins can interact with each other, or interact with proteins non-identified by proteomic approaches cited above. The information about the dynamics of these interactions is required for an in-depth deciphering of the molecular cross-talk.

Interactomics is an emerging discipline in the proteomics field (Fig. 2), which aims at identifying all the amenable molecular interactions in a given cell or other biological environment (apoplast, extracellular medium, blood, xylem, etc.). Any identified protein putatively encounters dynamic interactions with other molecules that could control a range of specific functions. Hence, a candidate protein could interact with others proteins (Fig. 2), or with DNA and RNA sequences (Fig. 2) to achieve a particular cellular role. Besides the bioinformatics methods that could predict many interactions of a candidate protein based on several criteria (Amino acids sequence of protein, 3D structure of the protein, sub-cellular localization, biochemical characteristics of the protein, etc.). More technical means are now available to validate the predicted interaction. Protein–protein interactions have been mainly performed using yeast two-hybrid screening (Y2H), tandem affinity purification (TAP) and coimmunoprecipitation (co-IP). For instance, a nice example is the identification of the CaHIR1 protein in the plant hypersensitive response (HR) and in the induction of cell death to *Xanthomonas filamentous* (Choi and Hwang, 2011). By using additional interactomics studies based on the Y2H and CoIP experiments, the authors revealed that small filamentous hemagglutinin-like protein (Fha1) of *Xanthomonas sp* interacts with CaHIR1 protein in *planta*. This protein acts as a virulence factor in host plants (Choi et al., 2013). Such techniques have also allowed the evidence of the gene for gene interaction in plants showing that a direct interaction of a plant resistant gene and parasite avirulence gene product confers resistance to several pathogens (Cesari et al., 2013; Deslandes et al., 2003; Dodds et al., 2006; Jia et al., 2000). In addition, several interactions between pathogen effectors and animal genes were observed (Blasche et al., 2013; Yang et al., 2013).

To analyze the interaction between a candidate protein and the DNA sequence, ChIP-sequencing, also known as ChIP-Seq is the mostly used method. ChIP-seq combines chromatin immunoprecipitation (ChIP) with extensive parallel DNA sequencing to identify the binding sites of DNA-associated proteins. It can be used to precisely map global binding sites for any protein of interest. These techniques could be used to study the involvement of proteins secreted and injected by the pathogens in host cells in order to regulate the infected host. These secreted proteins could be involved in hijacking of the host cells by remodeling of the host genome expression. Noteworthy, interactomics of host–parasite

association is not restricted to study molecular interactions involving both host and parasite components. The study of host-specific interactomics during the infection process (during the host–pathogen interaction), could provide valuable information about the host genome regulation (Berghout et al., 2013). Likewise, focusing on the pathogen side could provide useful information about the remodeling of pathogen molecular strategies during infection process (Mouveaux et al., 2014).

5. Guidelines to collect new key datasets

Collecting relevant data using the proteomics tools is far from trivial. To go further in the understanding of the complex host–parasite molecular cross-talk, our use of proteomics strategies needs to fit with the intricacy of the studied pathosystem. Whatever the question is, temporal variations in the cross-talk are crucial as relevant biological information is difficult to extract from a single time point and since most of molecular events are highly dynamic during the infection processes. Furthermore, the biological compartment (i.e. tissues) that will be submitted to differential proteomics must be carefully chosen in order to prevent non-specific responses and a failure to detect lowly abundant proteins from being detected because of major proteins being present. Tissue micro-dissection could be a strategy to reduce sample complexity by ways of excluding non-infected regions of the organ from the sample, or intracellular fractioning. Another approach would be to reduce complexity by studying specific parasite–host interactions in an *ex vivo* tissue culture system in which the parasite is presented with one tissue type of interest at a time (de Bekker et al., 2013). When studying a model where the parasite is suspected to hijack the host cell cycle, it could be pertinent to study the nuclear proteome variations. It is also crucial to focus on relevant protein populations that once again depend on the question raised. For example, the analysis of early molecular events and their cell signaling will be predominantly found within a specific subset of the proteome such as the phosphoproteome, whereas long-lasting responses controlling a sustainable gene expression remodeling could be seen in the whole proteome (Rayapuram et al., 2014).

In order to reduce some of the technical pitfalls that befell earlier proteomics methods, new strategies such as metabolic labeling can represent interesting alternatives. Although SILAC has several advantages, it is not always the best choice since this method is developed for cell cultures and its *in vivo* application is actually limited to model species with completely sequenced genome. However, it is possible to generate a database from transcriptomics data from a unsequenced organism and use this for mass spectrometry analysis bypassing this issue (Evans et al., 2012). New experimental methods such as SILAC and iTRAQ can give access to the interactome integration level which consists in all the host protein–parasite protein interactions that occur within a cell at a given time (Munday et al., 2012). Since these interactions, that can involve either two partners or large complexes, form the core of a wide number of cellular processes, their studies are of great importance to decipher the host–parasite molecular cross-talk. Currently, approaches in genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics and interactomics combined with bioinformatics allow an *in silico* modeling of host–parasite protein–protein interactions that will facilitate our understanding of the host–parasite molecular cross-talk. A high-throughput generic and multidisciplinary approach is missing to reveal parasite proteins and host–parasite protein–protein interactions (PPI) during the dynamics of an infection. Recent studies on parasite strategies of infection through the examining of the parasite–human interactome suggest that parasites belonging to the Bacteria Kingdom and to the viruses

could share molecular strategies to take control of host cellular functions. Moreover, their proteins seem to preferentially target “hubs,” i.e. highly connected proteins in the human PPI network (Durmuş Tekir et al., 2012; Khadka et al., 2011). These results therefore reveal a possible evolutionary convergence of molecular strategies in the hijacking of human cellular functions by parasites. However, no global study with parasites and hosts belonging to Phyla of different Kingdoms and portraying different parasite life-styles exists. We believe that a multidisciplinary approach combining efficient quantitative proteomics techniques and bioinformatics methods can deliver a temporal view of the molecular strategies employed by parasites belonging to different Kingdoms and Phyla. This approach, applied from sub-cellular compartments (nucleus, mitochondria, cytoplasm, and membrane) to the cellular level, should (i) reveal the host–parasite cross-talk implemented during hijacking, and (ii) allow us to test the hypothesis of a molecular convergence of parasite strategies in different Phyla of the Tree of Life.

6. Concluding remarks

Living organisms are constantly exposed to parasites. Whereas most host species have acquired strategies through selective pressure to mislead the parasite and to win the fight during their cross-talk, many parasite species have developed strategies to bypass the host's defenses and to ensure the completion of their life cycle, ultimately, winning the molecular war. New research challenges for the scientific community that tries to understand host–parasite cross-talk are: (i) how are the proteins involved in cross-talk activated? (ii) is the regulation/activation of host proteins induced at transcriptional, translational or post-translational level? (iii) can proteins identified in proteomics studies explain resistance or permanent susceptibility of hosts to (a) parasite(s)? (iv) what is the host–parasite cross-talk implemented during hijacking of host cellular functions by extra- and intra-cellular parasites? (v) which host cellular functions are perturbed by extra- and intra-cellular parasites to take control of host cell functioning? Indeed, elucidation of these complex molecular dialogues between hosts and parasites is clearly desirable not only to improve our understanding of parasite virulence but also to identify parasite-specific host biomarkers, and to define novel therapeutic targets. Among available quantitative approaches, the best one to adopt depends on the nature of the host–parasite association under investigation.

Acknowledgements

J.P. was supported by a scholarship from the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). C.C. was supported by a scholarship from the French National Institute for Agronomic Research (INRA).

References

- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787.
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- Agrios, G.N., 1997. *Plant Pathology, Experimental Agriculture*. Elsevier Science & Technology Books.
- Amey, R.C., Schleicher, T., Slinn, J., Lewis, M., Macdonald, H., Neill, S.J., Spencer-Phillips, P.T.N., 2008. Proteomic analysis of a compatible interaction between *Pisum sativum* (pea) and the downy mildew pathogen *Peronospora viciae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122, 41–55.
- Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., Courret, N., 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 6, 392–401.
- Ausubel, F.M., 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6, 973–979.
- Babujee, L., Venkatesh, B., Yamazaki, A., Tsuyumu, S., 2007. Proteomic analysis of the carbonate insoluble outer membrane fraction of the soft-rot pathogen *Dickeya dadantii* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) strain 3937. *J. Proteome Res.* 6, 62–69.
- Barrero, C.A., Datta, P.K., Sen, S., Deshmane, S., Amini, S., Khalili, K., Merali, S., 2013. HIV-1 Vpr modulates macrophage metabolic pathways: a SILAC-based quantitative analysis. *PLoS One* 8, e68376.
- Berard, A.R., Cortens, J.P., Krokhin, O., Wilkins, J.A., Severini, A., Coombs, K.M., 2012. Quantification of the host response proteome after mammalian reovirus T1L infection. *PLoS One* 7, e51939.
- Berghout, J., Langlais, D., Radovanovic, I., Tam, M., MacMicking, J.D., Stevenson, M.M., Gros, P., 2013. Irf8-regulated genomic responses drive pathological inflammation during cerebral malaria. *PLoS Pathog.* 9, e1003491.
- Beyer, T.V., Svezhova, N.V., Radchenko, A.I., Sidorenko, N.V., 2002. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem). *Cell Biol. Int.* 26, 861–871.
- Biron, D.G., Loxdale, H.D., Université, C., Pascal, U.B., Génome, M., 2013. Host – parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite. *J. Exp. Biol.*, 148–160.
- Biron, D.G., Moura, H., Marche, L., Hughes, A.L., Thomas, F., 2005. Towards a new conceptual approach to “parasitoproteomics”. *Trends Parasitol.* 21, 162–168.
- Biron, D.G., Nedelkov, D., Missé, D., Holzmüller, P., 2011. Proteomics and host pathogen interactions: bright future? In: *Genetics and Evolution of Infectious Diseases, (E)lsevier (I)nsights (S)eries*. Elsevier, pp. 263–303.
- Blasche, S., Mörtl, M., Steuber, H., Siszler, G., Nisa, S., Schwarz, F., Lavrik, I., Gronewold, T.M.A., Maskos, K., Donnenberg, M.S., Ullmann, D., Uetz, P., Kögl, M., 2013. The *E. coli* effector protein NleF is a caspase inhibitor. *PLoS One* 8, e58937.
- Boehm, T., 2012. Evolution of vertebrate immunity. *Curr. Biol.* 22, R722–R732.
- Brotherton, M.-C., Bourassa, S., Leprohon, P., Légaré, D., Poirier, G.G., Droit, A., Ouellette, M., 2013. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant *Leishmania infantum* mutant. *PLoS One* 8, e81899.
- Burnet, F.M., 1961. Immunological recognition of self. *Science* 133, 307–311.
- Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., Morel, J.-B., Fournier, E., Tharreau, D., Terauchi, R., Kroi, T., 2013. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognizes the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR1-CO39 by direct binding. *Plant Cell* 25, 1463–1481.
- Charley, B., Riffault, S., Van Reeth, K., 2006. Porcine innate and adaptive immune responses to influenza and coronavirus infections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 130–136.
- Choi, D.S., Hwang, B.K., 2011. Proteomics and functional analyses of pepper abscisic acid-responsive 1 (ABR1), which is involved in cell death and defense signaling. *Plant Cell* 23, 823–842.
- Choi, H.W., Kim, D.S., Kim, N.H., Jung, H.W., Ham, J.H., Hwang, B.K., 2013. *Xanthomonas* filamentous hemagglutinin-like protein Fha1 interacts with pepper hypersensitive-induced reaction protein CaHRI1 and functions as a virulence factor in host plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 1441–1454.
- Chung, J.W., Speert, D.P., 2007. Proteomic identification and characterization of bacterial factors associated with *Burkholderia cenocepacia* survival in a murine host. *Microbiology* 153, 206–214.
- Coiras, M., Camafeita, E., López-Huertas, M.R., Calvo, E., López, J.A., Alcamí, J., 2008. Application of proteomics technology for analyzing the interactions between host cells and intracellular infectious agents. *Proteomics* 8, 852–873.
- Colditz, F., Nyamsuren, O., Niehaus, K., Eubel, H., Braun, H.-P., Krajinski, F., 2004. Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Mol. Biol.* 55, 109–120.
- Cui, S.-J., Xu, L.-L., Zhang, T., Xu, M., Yao, J., Fang, C.-Y., Feng, Z., Yang, P.-Y., Hu, W., Liu, F., 2013. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host–parasite interactions. *J. Proteomics* 84, 158–175.
- Dangl, J.L., Jones, J.D., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- De Bekker, C., Smith, P.B., Patterson, A.D., Hughes, D.P., 2013. Metabolomics reveals the heterogeneous secretome of two entomopathogenic fungi to ex vivo cultured insect tissues. *PLoS One* 8, e70609.
- De Moraes Guedes, S., Vitorino, R., Domingues, R., Tomer, K., Correia, A.J., Amado, F., Domingues, P., 2005. Proteomics of immune-challenged *Drosophila melanogaster* larvae hemolymph. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 106–115.
- Dean, P., 2011. Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 1100–1125.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounloham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y., 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8024–8029.
- DeYoung, B.J., Innes, R.W., 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol.* 7, 1243–1249.
- Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., Fu, Z.F., 2005. New frontiers in proteomics research: a perspective. *Int. J. Pharm.* 299, 1–18.
- Dietrich, A., Mayer, J.E., Hahlbrock, K., 1990. Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265, 6360–6368.
- Dóczy, R., Okrés, L., Romero, A.E., Paccanaro, A., Bögre, L., 2012. Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends Plant Sci.* 17, 518–525.

- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I.A., Ayliffe, M.A., Kobe, B., Ellis, J.G., 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8888–8893.
- Donnelly, M.A., Steiner, T.S., 2002. Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J. Biol. Chem.* 277, 40456–40461.
- Dornez, E., Croes, E., Gebruers, K., Carpentier, S., Swennen, R., Laukens, K., Witters, E., Urban, M., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2010. 2-D DIGE reveals changes in wheat xylanase inhibitor protein families due to *Fusarium graminearum* DeltaTri5 infection and grain development. *Proteomics* 10, 2303–2319.
- Dreisbach, A., van der Kooi-Pol, M.M., Otto, A., Gronau, K., Bonarius, H.P.J., Westra, H., Groen, H., Becher, D., Hecker, M., van Dijk, J.M., 2011. Surface shaving as a versatile tool to profile global interactions between human serum proteins and the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Proteomics* 11, 2921–2930.
- Durmuş Tekir, S., Cakir, T., Ulgen, K.Ö., 2012. Infection strategies of bacterial and viral pathogens through pathogen-human protein–protein interactions. *Front. Microbiol.* 3, 46.
- Elde, N.C., Malik, H.S., 2009. The evolutionary conundrum of pathogen mimicry. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 787–797.
- Emilianowicz, W., 1952. Viability of anti-Vi bacteriophage in aquatic environment; comparative study with viability of homologous typhoid bacteria. *Biul. Państw. Inst. Med. Morsk. Trop. J W Gdańsku* 4, 331–338.
- Evans, V.C., Barker, G., Heesom, K.J., Fan, J., Bessant, C., Matthews, D.A., 2012. De novo derivation of proteomes from transcriptomes for transcript and protein identification. *Nat. Methods* 9, 1207–1211.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T., 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18, 265–276.
- Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M., Basse, C.W., Boller, T., 1991. Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells: characterization and use as a bioassay for elicitor action. *Plant Physiol.* 97, 19–25.
- Fugmann, S.D., 2010. The origins of the Rag genes – from transposition to V(D)J recombination. *Semin. Immunol.* 22, 10–16.
- Girardin, S.E., Sansonetti, P.J., Philpott, D.J., 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens – common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 10, 193–199.
- Gómez-Gómez, L., Bauer, Z., Boller, T., 2001. Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1155–1163.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T., 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5, 1003–1011.
- Grishin, A.M., Beyrakhova, K.A., Cygler, M., 2015. Structural insight into effector proteins of Gram-negative bacterial pathogens that modulate the phosphoproteome of their host. *Protein Sci.*
- Gstaiger, M., Aebersold, R., 2009. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat. Rev. Genet.* 10, 617–627.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S., Somers, D.J., 2012. Integrated metabolite-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS One* 7, e40695.
- Herbinière, J., Grève, P., Strub, J.-M., Thiersé, D., Raimond, M., van Dorsselaer, A., Martin, G., Braquart-Varnier, C., 2008. Protein profiling of hemocytes from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 875–882.
- Hewezi, T., Baum, T.J., 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 9–16.
- Higgins, M.K., Carrington, M., 2014. Sequence variation and structural conservation allows development of novel function and immune evasion in parasite surface protein families. *Protein Sci.* 23, 354–365.
- Hughes, C., Krijgsvelde, J., 2012. Developments in quantitative mass spectrometry for the analysis of proteome dynamics. *Trends Biotechnol.* 30, 668–676.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., Valent, B., 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19, 4004–4014.
- Jones, A.M.E., Thomas, V., Truman, B., Lilley, K., Mansfield, J., Grant, M., 2004. Specific changes in the *Arabidopsis* proteome in response to bacterial challenge: differentiating basal and R-gene mediated resistance. *Phytochemistry* 65, 1805–1816.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Karvonen, A., Seehausen, O., 2012. The role of parasitism in adaptive radiations—when might parasites promote and when might they constrain ecological speciation? *Int. J. Ecol.* 2012, 1–20.
- Keen, N., Staskawicz, B., Mekalanos, J., Ausubel, F., Cook, R.J., 2000. Pathogens and hosts: the dance is the same, the couples are different. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8752–8753.
- Khadka, S., Vangeloff, A.D., Zhang, C., Siddavatam, P., Heaton, N.S., Wang, L., Sengupta, R., Sahasrabudhe, S., Randall, G., Gribskov, M., Kuhn, R.J., Perera, R., LaCount, D.J., 2011. A physical interaction network of dengue virus and human proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 10 (M111), 012187.
- Kim, S.T., Cho, K.S., Yu, S., Kim, S.G., Hong, J.C., Han, C., Bae, D.W., Nam, M.H., Kang, K.Y., 2003. Proteomic analysis of differentially expressed proteins induced by rice blast fungus and elicitor in suspension-cultured rice cells. *Proteomics* 3, 2368–2378.
- Kolmeder, C.A., de Vos, W.M., 2014. Metaproteomics of our microbiome – developing insight in function and activity in man and model systems. *J. Proteomics* 97, 3–16.
- Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Kuris, A.M., 2006. Parasites dominate food web links. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 11211–11216.
- Lamont, E.A., Janagama, H.K., Ribeiro-Lima, J., Vulchanova, L., Seth, M., Yang, M., Kurmi, K., Waters, W.R., Thacker, T., Sreevatsan, S., 2014. Circulating *Mycobacterium bovis* peptides and host response proteins as biomarkers for unambiguous detection of subclinical infection. *J. Clin. Microbiol.* 52, 536–543.
- Lecourieux-Ouaked, F., Pugin, A., Lebrun-Garcia, A., 2000. Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogin, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 821–829.
- Lepargneur, J.-P., Abbal, M., 2012. Innate and adaptive immunity of the female genital tract. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* 41, 612–622.
- Levy, F., Rabel, D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Ehret-Sabatier, L., 2004. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie* 86, 607–616.
- Li, Y., Ye, Z., Nie, Y., Zhang, J., Wang, G.-L., Wang, Z., 2015. Comparative phosphoproteome analysis of *Magnaporthe oryzae*-responsive proteins in susceptible and resistant rice cultivars. *J. Proteomics* 115, 66–80.
- McGuinness, D.H., Dehal, P.K., Pleass, R.J., 2003. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol.* 19, 312–319.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298–300.
- Mehta, A., Brasileiro, A.C.M., Souza, D.S.L., Romano, E., Campos, M.A., Grossi-de-Sá, M.F., Silva, M.S., Franco, O.L., Frago, R.R., Bevitore, R., Rocha, T.L., 2008a. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? *FEBS J.* 275, 3731–3746.
- Mehta, A., Magalhães, B.S., Souza, D.S.L., Vasconcelos, E.A.R., Silva, L.P., Grossi-de-Sa, M.F., Franco, O.L., da Costa, P.H.A., Rocha, T.L., 2008b. Rootomics: the challenge of discovering plant defense-related proteins in roots. *Curr. Protein Pept. Sci.* 9, 108–116.
- Mei, B., Ding, X., Xu, H.-Z., Wang, M.-T., 2014. Global gene expression changes in human peripheral blood after H7N9 infection. *Gene* 551, 255–260.
- Meijer, H.J.G., van de Vondervoort, P.J.I., Yin, Q.Y., de Koster, C.G., Klis, F.M., Govers, F., de Groot, P.W.J., 2006. Identification of cell wall-associated proteins from *Phytophthora ramorum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 1348–1358.
- Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., Young, N.D., 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20, 317–332.
- Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J.-W., Mortensen, P., Otto, T., Nalli, A., Tang, Q.-Q., Lane, M.D., Chaerkady, R., Pandey, A., 2009. Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J. Proteome Res.* 8, 48–58.
- Mouveaux, T., Oria, G., Werkmeister, E., Slomianky, C., Fox, B.A., Bzik, D.J., Tomavo, S., 2014. Nuclear glycolytic enzyme enolase of *Toxoplasma gondii* functions as a transcriptional regulator. *PLoS One* 9, e105820.
- Munday, D.C., Surtees, R., Emmott, E., Dove, B.K., Digard, P., Barr, J.N., Whitehouse, A., Matthews, D., Hiscox, J.A., 2012. Using SILAC and quantitative proteomics to investigate the interactions between viral and host proteomes. *Proteomics* 12, 666–672.
- Niederberger, E., Geisslinger, G., 2013. Proteomics and NF-κB: an update. *Expert Rev. Proteomics* 10, 189–204.
- Nühse, T.S., Bottrill, A.R., Jones, A.M.E., Peck, S.C., 2007. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J.* 51, 931–940.
- Nürnberg, T., Brunner, F., 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 318–324.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L., 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* 198, 249–266.
- Otto, A., Becher, D., Schmidt, F., 2014. Quantitative proteomics in the field of microbiology. *Proteomics* 14, 547–565.
- Panek, J., El Alaoui, H., Mone, A., Urbach, S., Demetere, E., Texier, C., Brun, C., Zanzoni, A., Peyretailade, E., Parisot, N., Lerat, E., Peyret, P., Delbac, F., Biron, D.G., 2014. Hijacking of host cellular functions by an intracellular parasite, the microsporidian *Anncalia algerae*. *PLoS One* 9, e100791.
- Parker, B.J., Barribeau, S.M., Laughton, A.M., de Roode, J.C., Gerardo, N.M., 2011. Non-immunological defense in an evolutionary framework. *Trends Ecol. Evol.* 26, 242–248.
- Parker, J., Koh, J., Yoo, M.-J., Zhu, N., Feole, M., Yi, S., Chen, S., 2013. Quantitative proteomics of tomato defense against *Pseudomonas syringae* infection. *Proteomics* 13, 1934–1946.
- Patramool, S., Choumet, V., Surasombatpattana, P., Sabatier, L., Thomas, F., Thongrungrat, S., Rabilloud, T., Boulanger, N., Biron, D.G., Missé, D., 2012. Update on the proteomics of major arthropod vectors of human and animal pathogens. *Proteomics* 12, 3510–3523.
- Pemberton, A.D., Knight, P.A., Wright, S.H., Miller, H.R.P., 2004. Proteomic analysis of mouse jejunal epithelium and its response to infection with the intestinal nematode, *Trichinella spiralis*. *Proteomics* 4, 1101–1108.
- Pitzschke, A., Schikora, A., Hirt, H., 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 421–426.
- Pombo, M.A., Zheng, Y., Fernandez-Pozo, N., Dunham, D.M., Fei, Z., Martin, G.B., 2014. Transcriptomic analysis reveals tomato genes whose expression is induced specifically during effector-triggered immunity and identifies the

- EpK1 protein kinase which is required for the host response to three bacterial effector proteins. *Genome Biol.* 15, 492.
- Rayapuram, N., Bonhomme, L., Bigeard, J., Haddadou, K., Przybylski, C., Hirt, H., Pflieger, D., 2014. Identification of novel PAMP-triggered phosphorylation and dephosphorylation events in *Arabidopsis thaliana* by quantitative phosphoproteomic analysis. *J. Proteome Res.* 13, 2137–2151.
- Reales-Calderón, J.A., Sylvester, M., Strijbis, K., Jensen, O.N., Nombela, C., Molero, G., Gil, C., 2013. *Candida albicans* induces pro-inflammatory and anti-apoptotic signals in macrophages as revealed by quantitative proteomics and phosphoproteomics. *J. Proteomics* 91C, 106–135.
- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C., 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.* 130, 904–917.
- Roe, A.J., Tysall, L., Dransfield, T., Wang, D., Fraser-Pitt, D., Mahajan, A., Constandinou, C., Inglis, N., Downing, A., Talbot, R., Smith, D.G., Gally, D.L., 2007. Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiology* 153, 1350–1360.
- Rohfritsch, O., 2008. Plants, gall midges, and fungi: a three-component system. *Entomol. Exp. Appl.* 128, 208–216.
- Rudd, J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., Lysenko, A., Saqi, M., Desai, N., Powers, S., Hooper, J., Ambroso, L., Bharti, A., Farmer, A., Hammond-Kosack, K., Dietrich, R., Courbot, M., 2015. Transcriptome and metabolite profiling the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat (*Triticum aestivum*) reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions, and a variation on the hemibiotro. *Plant Physiol.*
- Sakaguchi, A., Matsumoto, K., Hisamoto, N., 2004. Roles of MAP kinase cascades in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem.* 136, 7–11.
- Schenkluhn, L., Hohnjec, N., Niehaus, K., Schmitz, U., Colditz, F., 2010. Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome. *J. Proteomics* 73, 753–768.
- Schmid-Hempel, P., 2011. *Evolutionary Parasitology: The Integrated Study of Infections, Immunology, Ecology, and Genetics*/by Paul Schmid-Hempel. Oxford University Press, Oxford.
- Teixeira, M.M., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T., 2002. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. *Microbes Infect.* 4, 883–886.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 103–110.
- Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071–2077.
- Urbaniak, M.D., Guthrie, M.L.S., Ferguson, M.A.J., 2012. Comparative SILAC proteomic analysis of *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic lifecycle stages. *PLoS One* 7, e36619.
- Verleyen, P., Baggerman, G., D'Hertog, W., Vierstraete, E., Husson, S.J., Schoofs, L., 2006. Identification of new immune induced molecules in the haemolymph of *Drosophila melanogaster* by 2D-nanoLC MS/MS. *J. Insect Physiol.* 52, 379–388.
- Viard, M.P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.P., 1994. Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* 104, 1245–1249.
- Wan, J., Torres, M., Ganapathy, A., Thelen, J., DaGue, B.B., Mooney, B., Xu, D., Stacey, G., 2005. Proteomic analysis of soybean root hairs after infection by *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 458–467.
- Wu, Z., Sahin, O., Wang, F., Zhang, Q., 2014. Proteomic identification of immunodominant membrane-related antigens in *Campylobacter jejuni* associated with sheep abortion. *J. Proteomics* 99, 111–122.
- Yang, H., Tan, Y., Zhang, T., Tang, L., Wang, J., Ke, Y., Guo, Z., Yang, X., Yang, R., Du, Z., 2013. Identification of novel protein–protein interactions of *Yersinia pestis* type III secretion system by yeast two hybrid system. *PLoS One* 8, e54121.
- Yao, Y.A., Wang, J., Ma, X., Lutts, S., Sun, C., Ma, J., Yang, Y., Achal, V., Xu, G., 2012. Proteomic analysis of Mn-induced resistance to powdery mildew in grapevine. *J. Exp. Bot.* 63, 5155–5170.
- Zhang, C.G., Chromy, B.A., McCutchen-Maloney, S.L., 2005. Host-pathogen interactions: a proteomic view. *Expert Rev. Proteomics* 2, 187–202.

CHAPITRE IV: DECRYPTAGE DU DIALOGUE
MOLECULAIRE ENTRE UNE MICROSPORIDIE ET SON
HOTE A L'ECHELLE CELLULAIRE

Cette première étude de l'interaction au niveau cellulaire a été réalisée dans le cadre du projet PEPS CNRS SILACFOOD. Ce projet exploratoire a été effectué en collaboration avec l'équipe « Génétique, Diversité et Ecophysiologie des Céréales » de l'INRA de Crouel et la plateforme de protéomique fonctionnelle de Montpellier. Le but était de générer des données originales concernant le décryptage du dialogue moléculaire hôte-parasite dans deux systèmes biologiques, un végétal (*Fusarium graminearum* - Blé) et un animal (*A. algerae* – cellules humaines) à l'aide de la technique de protéomique SILAC. Ce projet avait également pour objectif de démontrer la faisabilité et la puissance du protocole expérimental dans le but de déposer par la suite un projet ANR plus ambitieux.

Plus de la moitié de la vie sur terre est parasitaire, et celle-ci serait plus importante que la prédation (Lafferty et al., 2006; Schmid-Hempel, 2011). Ainsi une importante partie des organismes vivants ont opté pour le mode de vie parasitaire au cours de leur évolution, envahissant des organismes de leur propre règne ou non, à des niveaux intra ou extra cellulaires (Schmid-Hempel, 2011). Afin de s'adapter à ce mode vie, ils ont dû acquérir des stratégies leur permettant d'atteindre une niche écologique appropriée dans leur hôte, mais également, afin d'avoir accès aux nutriments nécessaires à leur survie et à leur développement. Pour cela ces parasites ont, au cours de leur coévolution avec leur hôte, mis en place différentes stratégies pour pirater les grandes fonctions cellulaires de leur(s) hôte(s). Comme nous l'avons déjà rappelé dans le **chapitre II.1.2**, le parasitisme intracellulaire obligatoire étant vraisemblablement l'aboutissement ultime de la coévolution entre un parasite et son hôte, ces parasites sont ceux qui présentent les stratégies les plus poussées de piratage de leurs hôtes. En effet, ce mode de vie rend nécessaire des adaptations sophistiquées afin d'accéder aux nutriments, d'interagir avec les différentes voies de signalisation et de reconnaissance mais également d'assurer l'entrée et la sortie de la cellule hôte. C'est pourquoi l'étude de ce type d'interaction est susceptible de fournir des données importantes sur la compréhension des stratégies moléculaires utilisées pour pirater les fonctions cellulaires de l'hôte. Les microsporidies, de par leur forte dépendance vis-à-vis de leur hôte (Texier et al., 2010) sont ainsi des modèles de choix pour l'étude de l'interaction hôte-parasite (**Chapitre II.2.4**).

Il a déjà été suggéré que les microsporidies semblaient être capables de pirater certains réseaux protéiques de l'hôte pour contrôler leur cycle cellulaire et en particulier l'apoptose qui est

un moyen d'éliminer les cellules infectées. *A. algerae* et *E. cuniculi* sont ainsi capables de limiter l'entrée en apoptose des cellules qu'elles infectent bien que les mécanismes soient encore mal connus (del Aguila et al., 2006; Scanlon et al., 2000). Les microsporidies étant également dépendantes de leurs hôtes au niveau de leur production d'énergie, il semblerait qu'elles soient également capables de détourner les voies de production d'énergie de la cellule hôte en ciblant les mitochondries. En effet, l'infection par les microsporidies provoque une relocalisation des mitochondries de la cellule-hôte qui se positionnent autour des foyer infectieux (Scanlon et al., 2004). Cette idée semble être renforcée par l'acquisition de certains gènes, notamment par transferts horizontaux, leur permettant de pirater les ressources énergétiques et métaboliques de l'hôte.

Ayant très peu d'information sur l'interaction cellules HFF – *A. algerae*, et en nous basant sur l'étude bibliographique présentée dans le chapitre précédant, nous avons opté pour une approche de protéomique quantitative et différentielle sans a priori afin de décrypter la réponse protéique des cellules HFF à l'infection par *A. algerae*. La technique SILAC a été utilisée pour suivre cette réponse dans le temps (0h, 6h, 12h, 24h et 8j après infection). Cette approche se base sur le marquage du protéome de l'hôte à l'aide d'acides aminés marqués (lysine). Cette première étude qui a été publiée dans la revue *PLOS ONE* en 2014, nous a ainsi permis d'avoir un aperçu de la réponse protéique des cellules HFFs à l'infection par *A. algerae* grâce à l'identification de 87 protéines dont l'abondance varie de façon significative au cours du temps. Cette expérimentation nous a également permis de détecter 148 protéines du parasite, dont 18 présenteraient un peptide signal, et seraient donc de potentiels effecteurs de pathogénie sécrétés par le parasite au cours du processus infectieux. Toutefois, cette étude n'a pas permis d'identifier des perturbations communes entre *A. algerae* et *N. ceranae*.



Hijacking of Host Cellular Functions by an Intracellular Parasite, the Microsporidian *Anncaliia algerae*

Johan Panek^{1,2}, Hicham El Alaoui^{1,2*}, Anne Mone^{1,2}, Serge Urbach³, Edith Demettré⁴, Catherine Texier^{1,2}, Christine Brun^{5,6,7}, Andreas Zanzoni^{5,6}, Eric Peyretailade^{8,9}, Nicolas Parisot^{8,9}, Emmanuelle Lerat¹⁰, Pierre Peyret^{8,9}, Frederic Delbac^{1,2}, David G. Biron^{1,2*}

1 Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, Clermont-Ferrand, France, **2** CNRS, UMR 6023, LMGE, Aubière, France, **3** Functional Proteomics Platform. UMR CNRS 5203, Montpellier, France, **4** Functional Proteomics Platform. UMS CNRS 3426, Montpellier, France, **5** INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, France, **6** Aix-Marseille Université, UMR1090 TAGC, Marseille, France, **7** CNRS, Marseille, France, **8** Clermont Université, Université d'Auvergne, I.U.T., UFR Pharmacie, Clermont-Ferrand, France, **9** Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4678, Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, Clermont-Ferrand, France, **10** Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Villeurbanne, France

Abstract

Intracellular pathogens including bacteria, viruses and protozoa hijack host cell functions to access nutrients and to bypass cellular defenses and immune responses. These strategies have been acquired through selective pressure and allowed pathogens to reach an appropriate cellular niche for their survival and growth. To get new insights on how parasites hijack host cellular functions, we developed a SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell culture) quantitative proteomics workflow. Our study focused on deciphering the cross-talk in a host-parasite association, involving human foreskin fibroblasts (HFF) and the microsporidia *Anncaliia algerae*, a fungus related parasite with an obligate intracellular lifestyle and a strong host dependency. The host-parasite cross-talk was analyzed at five post-infection times 1, 6, 12 and 24 hours post-infection (hpi) and 8 days post-infection (dpi). A significant up-regulation of four interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats IFIT1, IFIT2, IFIT3 and MX1 was observed at 8 dpi suggesting a type 1 interferon (IFN) host response. Quantitative alteration of host proteins involved in biological functions such as signaling (STAT1, Ras) and reduction of the translation activity (EIF3) confirmed a host type 1 IFN response. Interestingly, the SILAC approach also allowed the detection of 148 *A. algerae* proteins during the kinetics of infection. Among these proteins many are involved in parasite proliferation, and an over-representation of putative secreted effectors proteins was observed. Finally our survey also suggests that *A. algerae* could use a transposable element as a lure strategy to escape the host innate immune system.

Citation: Panek J, El Alaoui H, Mone A, Urbach S, Demettré E, et al. (2014) Hijacking of Host Cellular Functions by an Intracellular Parasite, the Microsporidian *Anncaliia algerae*. PLoS ONE 9(6): e100791. doi:10.1371/journal.pone.0100791

Editor: Jörn Coers, Duke University Medical Center, United States of America

Received: April 7, 2014; **Accepted:** May 29, 2014; **Published:** June 26, 2014

Copyright: © 2014 Panek et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by a grant, Projets Exploratoires Pluridisciplinaires (PEPS) from the Centre National de la Recherche Scientifique (France) (CNRS SILACFOOD). J.P. was supported by a scholarship from the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: Hicham.EL_ALAOUI@univ-bpclermont.fr (HEA); david.biron1@univ-bpclermont.fr (DGB)

Introduction

More than half of life in ecosystems is parasite and, as a life history strategy, parasitism has evolved more times than predation [1,2]. A large part of the living organisms, at different times during the evolution of life and in each Kingdom opted and/or were under duress to invade other organisms, from their respective Kingdom or not, at extra- or intra- cellular levels [2]. This allowed them to reach an appropriate cellular niche (i.e. microhabitat), and gave them access to the nutrients needed for their growth and their survival. To achieve this, parasites need to hijack host cellular functions. For a large number of host-parasite associations, the arms race between partners has been ongoing for several hundred million years [2,3], a struggle that has so far led to the selection of different parasite cellular lifestyles until the intracellular-obligate parasitic state. Although parasites exist in virtually every conceivable host niche, no parasite lifestyle is as specialized as obligate

intracellular one. This parasite lifestyle influences access to nutrients, interactions with host cells signaling pathways and detection by parasite recognition systems. As such, intracellular life requires quite a repertoire of adaptations in order to ensure entry-exit from the cell, as well as to counter innate immune mechanisms and prevent clearance. The deciphering of this kind of host-parasite cross-talk at cellular and molecular levels is essential to the understanding of the key molecular strategies shared by obligate intracellular parasites in the hijacking of host cellular functions [2–5].

Microsporidia have been shown to cluster at the base of the fungal kingdom, as a sister group to chytrid pathogen *Rozella allomyces* [6]. They are all obligate intracellular parasites and 1,300 to 1,500 species in 187 genera were described that can infect a wide range of hosts from insects to mammals [7]. With some of the smallest eukaryotic genomes (from 2.3 to 24 Mb) and characterized by a strong host dependency the microsporidia phylum is

therefore particularly interesting to study as a source of pioneer data on the host-intracellular parasite cross-talk. This strong host dependency is illustrated by an extensive gene loss and a genome compaction (i.e. the lack of and/or reduction in the number of genes coding for numerous metabolic pathways well conserved in eukaryotes, and also simplification of cellular processes such as transcription) [8–12]. Since their discovery in the 1850s as the causative agent of the silkworm disease (works of Balbiani and Pasteur) [10] which devastated the silk industry in Europe, many studies have been conducted on these intracellular parasites because of their major impact on animal farming, for instance in beekeeping (*Nosema ceranae* and *Nosema apis*), in sericulture (*Nosema bombycis*) and in aquaculture (*Loma salmonae* for salmonid or *Thelohania* spp. for shrimp). Microsporidia have also been considered as opportunistic parasites in human and listed as a public health threat since the AIDS pandemic. The Microsporidia had been added to the National Institute of Allergy and Infectious diseases priority parasite list (category B, Biological Diseases, Food and Waterborne Pathogens) [10]. *Anncaliia algerae*, was first isolated from *Anopheles stephensis* at the aquatic larval stage. It is one of the microsporidian species with the broadest known host range [13] and can infect both immuno-competent and immuno-compromised patients [13]. Furthermore, mosquitoes co-infected with *A. algerae* and *Plasmodium falciparum* exhibit reduced *P. falciparum* development, suggesting that *A. algerae* enforces a biological defense against the causative agent of malaria [14]. Finally, *A. algerae* is an appropriate parasite model to study host-intracellular parasite cross-talk because of its ability to grow *in vitro* within a large diversity of cells and temperatures [15], and of the availability of its complete genome sequence harboring only 2,075 protein encoding genes [16].

Many scientists are heavily betting on “omics” tools to decode cross-talk in host-parasite associations and, thus, to first understand parasite molecular strategies to bypass host defenses. However, although genomic tools can provide great insights in such quests, the execution of the genetic plan is carried out for a large part by the proteins activities [17] and that is why many proteomics studies in the last decade have aimed at elucidating the host-parasite interactions. The use of proteomics has been promoted by the development of new user-friendly tools such as free gel approaches [18,19]. Quantitative metabolic labelling techniques such as SILAC (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture) have frequently been coupled to Mass Spectrometry (MS) for acquisition of quantitative data on changes in protein abundance between cells or experimental conditions [18]. This powerful method was first used to identify and quantify relative differential changes in complex protein samples [20]. As a result, SILAC opens new opportunities for the elucidation of host-parasite cross-talk involved in the hijacking of host cellular functions by parasites [5,21], and has been successfully used in similar studies on host-viruses interactions [21]. Our data deliver for the first time a temporal view of the host-parasite cross-talk during hijacking of host cellular functions in a minimal host-parasite interaction model. Key insights are the host interferon response against a microsporidia and the possible activation of parasite transposable elements (i.e. lure parasite strategy against host innate immune system).

Material and Methods

Workflow

We investigated a minimal host-parasite interaction model (i.e. parasite with a strong host dependency) namely *A. algerae* while infecting human foreskin fibroblasts (HFF) to figure out the specific

molecular cross-talk during the infection at two different time scales: early (1 hour post-infection (hpi), 6 hpi, 12 hpi and 24 hpi) and late (8 days post-infection (dpi)). In our experimental system, we observed meront stages 24 hpi, and after a proliferative step, mature spores are formed 3 dpi (figure S1). Finally, the majority of HFF cells are infected 8 dpi as shown in figure S1. In proteomics analysis several proteins have been shown to be modulated whatever the stress source [22]. In order to be able to spot and eliminate host proteins not being specifically modulated by the infection condition, we decided to compare with the host response when submitted to an abiotic stress (i.e. hypoxic) at two different cell ages (24 h and 8 d). Proteomics analyses were led by the labelling in cell culture of HFF with stable isotope ($^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -lysine) amino acids before the infection (or hypoxic stress), then followed by a tandem mass spectrometry analysis of the proteins extracted at each time points (i.e. 1, 6, 12, 24 hpi and 8 dpi; 24 h and 8 d for the hypoxia). Using this experimental design, we were able to follow the specific kinetic response of both host and parasite proteomes at five post-infection times. The use of three biological replicates allowed a high sensitivity in the detection of weak relative changes in the abundance between different experimental conditions (Fig. 1).

Host and parasite material

Human foreskin fibroblasts (HFF)(ATCC SCRC-1041) cells were grown in SILAC Dulbecco's modified MEM (DMEM, PAA) in a 5% CO_2 incubator at 37°C. The *A. algerae* isolate used in this study was kindly provided by Pr. W.A. Maier (University of Sigmund-Freud, Bonn) and it is the same organism as in the original description of the parasite in the paper of Vavra and Undeen (1970) (reference ATCC PRA-339) [23].

Culture medium, reagents and incorporation test

HFF cells were cultured as monolayers in DMEM supplemented with 10% heat inactivated dialyzed FBS (Invitrogen), 2 mM L-glutamine, arginine 84 mg/L, antibiotics (penicillin 100 U/ml-streptomycin 100 µg/ml, ampicillin 0.2 mg/ml) and fungicide (amphotericin B 0.25 µg/ml). For the SILAC experiments, cells were cultured in DMEM containing either $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -lysine (heavy SILAC medium) or $^{12}\text{C}_6^{13}\text{N}_2$ -lysine (light SILAC medium, unlabeled lysine) at the concentration of 150 mg/L. After five cell population doublings on 75 cm² culture flask, proteins were extracted from the heavy SILAC cells in 150 µl of Laemmli buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue and 0.0625 M TrisHCl pH 6.8), boiled for 15 min and centrifuged at 16,000×g at 4°C for 5 min. The protein concentrations of the cell lysates were determined with Bio-Rad Bradford Assay. The degree of incorporation of $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -lysine was evaluated by mass spectrometry according to Ong and Mann work [24]. The heavy HFF cells were trypsinized and mixed with control cells at a 1:1 ratio. The proteins were then extracted and quantified as described above. After separation by SDS-PAGE, total proteins were divided in 3 bands according to their molecular weight (Fig 1) and were processed for in-gel digestion with endoproteinase LysC. The peptides were analyzed by MS/MS. The heavy/light ratios were calculated for each protein.

SILAC experimental procedure

HFF labelled cells at confluence in 75 cm² flasks were treated with 1 ml of PBS, and exposed to two independent treatments (Fig. 1): (i) infected with 1×10^6 fresh spores of *A. algerae* (biotic stress), or (ii) placed in hypoxia for 1 h (abiotic stress) before each sampling (24 h and 8 d after the beginning of the experiment).

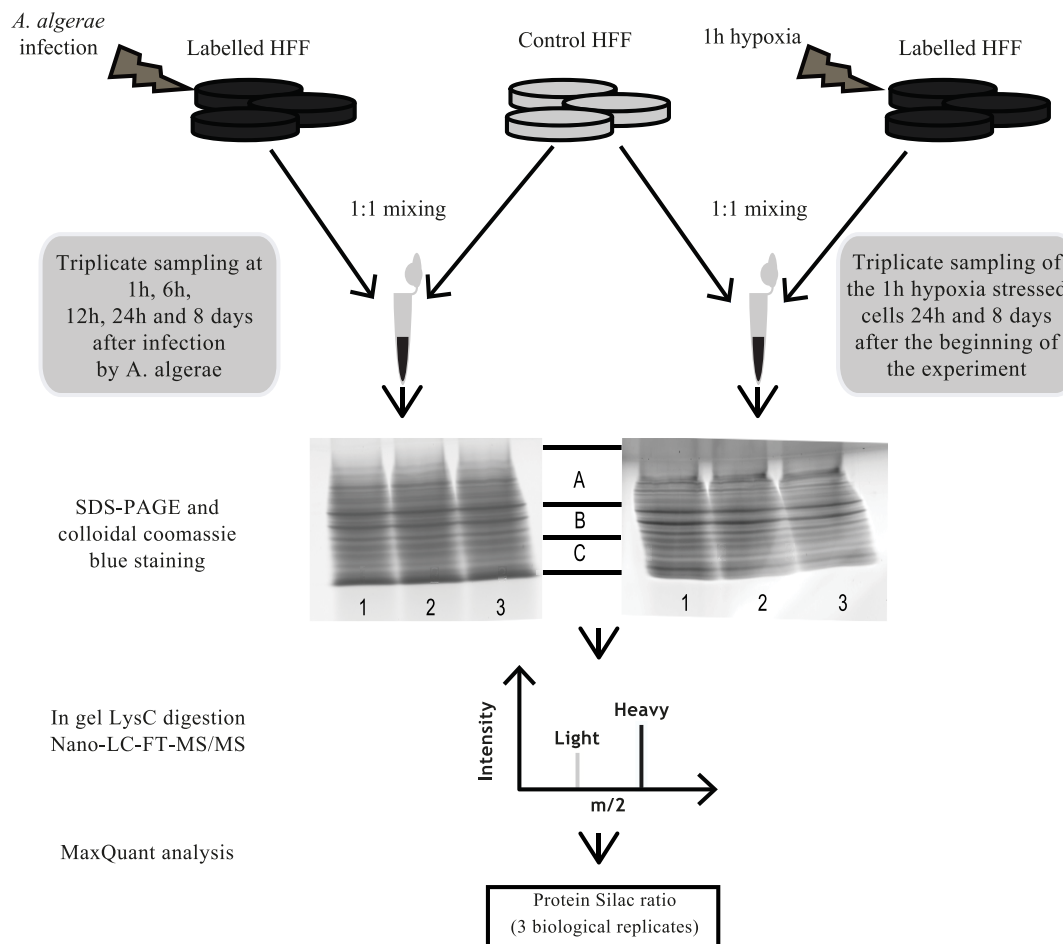


Figure 1. Workflow to decipher the molecular cross-talk between human cells and the obligate intracellular parasite *A. algerae* which is characterized by a strong host dependency. HFF cells labelled with $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_2$ -lysine (dark gray) were submitted to either infection by *A. algerae* or hypoxic stress. For each time point of both kinetics the labeled cells were combined at 1:1 ratio with unlabeled HFF cells (light gray) and proteins were extracted. For each sample a three biological replicate was made. The proteins samples were resolved on SDS-PAGE and total proteins lanes were cut in 3 regular pieces (A, B, C) and processed for in-gel digestion with endoproteinase LysC. LC-MS/MS analysis was then performed and mass spectra were analyzed with the MaxQuant software to achieve the relative protein quantification.
doi:10.1371/journal.pone.0100791.g001

The hypoxia condition was achieved by filling the flasks of control HFF cells with N_2 , the flasks were then hermetically sealed with parafilm for one hour. For the infection, the spores of *A. algerae* were left 1 h in contact with host cells before 3 washing steps with fresh medium. The light (unlabeled) HFF cells (control) were also treated with 1 ml of PBS (control). Either heavy or light HFF cells were then washed 3 times with fresh complete medium and sustained in culture for 8 days. For each time points (1 h, 6 h, 12 h, 24 h and 8 d) used to decipher host responses, the labelled and unlabeled HFF cells were dissociated with 0.05% trypsin-EDTA (Gibco). They were washed three times in PBS and manually counted. For each treatment (infection or hypoxia) and for each time point, 3 replicates of heavy HFF cells were combined at 1:1 ratio with light HFF cells, then centrifuged at 100 xg at 4°C for 5 min. The pellets were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until the end of the sampling procedure. Afterwards, proteins were extracted and quantified as described above.

Mass spectrometry data acquisition and processing

All time points of the *A. algerae* infection kinetics (1 hpi, 6 hpi, 12 hpi, 24 hpi and 8 dpi) and the two of the hypoxia samples (24 h and 8 d) were resolved on 12% SDS PAGE using the protean II xi cell system (Bio-Rad laboratories, Marnes-La-Coquette, France). Gels were stained with PAGE-Blue protein staining solution (Fermentas Vilnius, Lithuania) and scanned using a computer-assisted densitometer (EPSON Perfection V750PRO). Gel lanes were cut in 3 regular pieces and destained with two washes in 50% acetonitrile/50 mM triethylammonium bicarbonate. After protein reduction (10 mM dithiothreitol at 50°C for 1 h), and alkylation (55 mM iodoacetamide at room temperature for 30 min), proteins were processed for in-gel digestion over night at 25°C using LysC (2.2 µg/band, Wako, Osaka, Japan). Digested products were extracted with 50% acetonitrile/50 mM triethylammonium bicarbonate and then 5% formic acid. Peptide solutions were dehydrated in a vacuum centrifuge. The generated peptides were analyzed online by nano flowHPLC-nanoelectrospray ionization using an LTQ-XI Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled to an Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Thermo Fisher Scientific). Desalting and pre-concentra-

tion of samples were performed on-line on a Pepmap pre-column (0.3 mm×10 mm, Dionex). A gradient consisting of 0–40% B in A for 60 min, followed by 80% B/20% A for 15 min (A=0.1% formic acid, 2% acetonitrile in water; B=0.1% formic acid in acetonitrile) at 300 nL/min was used to elute peptides from the capillary reverse-phase column (0.075 mm×150 mm, Pepmap, Dionex). Eluted peptides were electrosprayed online at a voltage of 2.2 kV into an LTQ Orbitrap mass spectrometer. A cycle of one full-scan mass spectrum (400–2000 m/z) at a resolution of 60,000 (at 400 m/z) in the orbitrap, followed by 5 data-dependent MS/MS spectra (LTQ) was repeated continuously throughout the nanoLC separation.

Raw data analysis was performed using the MaxQuant software (V.1.3.0.5) [25]. Retention time-dependent mass recalibration was applied with the aid of a first search implemented in the Andromeda software [26] and peak lists were searched against the UniProt human database (release2013_04; <http://www.uniprot.org>) for the host response analysis and a local *A. algerae* database (supplementary data) for the parasite proteins detection, 255 frequently observed contaminants as well as reversed sequences of all entries. The following settings were applied: spectra were searched with a mass tolerance of 7 ppm (MS) and 0.5 Th (MS/MS). Enzyme specificity was set to LysC. Up to two missed cleavages were allowed and only peptides with at least six amino acids in length were considered. Oxidation on methionine was set as a variable modification. Peptides identifications were accepted based on their false discovery rate (<1%). Accepted peptide sequences were subsequently assembled by MaxQuant into proteins, to achieve a false discovery rate of 1% at the protein level. Relative protein quantifications in samples to be compared were performed based on the median SILAC ratios, using MaxQuant with standard settings. Significance thresholds were calculated by using Perseus (www.maxquant.org) based on significance A with a p-value of 0.01 for normalized peptide ratios. Graphical representations were generated using the R statistical environment (V.3.0.1) [27].

Bioinformatics analysis

A biological process Gene Ontology analysis was performed for each kinetic time points of the host. Differentially expressed proteins of the host at each time point were annotated with their Gene Ontology Biological Process terms [28] (Table S1). The annotation of the parasites proteome was conducted using Blast2Go (V.2.7.1) [29] with a BlastP algorithm using an e-value of 0.01 followed by an InterproScan step against the entire databases. The GO analysis was then finalized by merging the biological processes terms obtained after these two steps. The prediction of signal peptide cleavage sites was performed using the SignalP program, version 4.1 [30] set with the default parameters for eukaryotes.

Results

Host and parasite monitored proteins and incorporation rate of $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$ -lysine

Heavy/light ratios were calculated for each detected protein. The median of the incorporation rate for each protein was above 90% for the HFF cells, which is efficient for a good quantification of the host protein changes in abundance (Fig. 2). A total of 1,190 proteins were identified in the three biological replicates during the cross-talk between human cells and the microsporidian parasite: 1,041 for were quantified and corresponded to proteins from HFF cells. The 148 other proteins were from *A. algerae* and were probably detected because they were the most abundant parasite

proteins (Tables S2, S3). Analysis of the host proteome response to the hypoxic treatment revealed a total of 1,194 human proteins in the three biological replicates during the kinetics (Table S4). The correlation of the heavy/light protein abundance ratios showed a high reproducibility of protein quantification in the three biological replicates for each time points and for both stress conditions (i.e. parasite infection and hypoxia; Table S5).

Host proteome modulation

During the HFF cells-*A. algerae* cross-talk, 87 proteins of HFF cells significantly varied in expression ratio in at least one of the five time points (Fig. 3). Forty-three HFF proteins were differentially expressed after the hypoxic stress (Fig. 4) while only nine proteins were shared between infection and hypoxic treatments. These common proteins corresponded to three proteins of the cytoskeleton and the extracellular matrix (COL6A1, COL6A2, CNN1), two proteins involved in detoxification process (GSTM, NQO1), two involved in transcription/translation regulation (RALY, IGF2BP2), one HSP related protein (DNAJB11) and one protein of unknown function (GPNMB). These nine proteins were discarded for further interpretation of the kinetics of infection by *A. algerae*. For each kinetic time point, differentially expressed host proteins were annotated with GO Biological Process terms [28]. The percentage of dysregulated proteins annotated to each GO term is reported in Table S1.

Parasite proteome

Among the 148 parasite proteins detected during the HFF cells-*A. algerae* temporal cross-talk (Table S3). Most of these proteins were only detected for the 8 dpi time point, except for three: the 26S proteasome regulatory subunit 10 (detected at 6 hpi, 12 hpi, 24 hpi and 8 dpi), the endoplasmic reticulum membrane protein (detected at 6 hpi) and the glutamine amidotransferase (detected at 1 hpi, 24 hpi and 8 dpi). From the 148 *A. algerae* proteins, 20 showed no significant similarity with proteins in the RefSeq non-redundant database (nr) [31], even with an e-value threshold of 0.01. This suggests that these sequences are quite divergent from other known organism sequences. The SignalP program predicted the presence of a N-terminal signal peptide for 18 *A. algerae* proteins (Table S3). Interestingly Fisher's exact test confirms the over-representation of predicted secreted proteins among the 148 identified proteins (p-value = 3.467×10^{-4}) when compared to the predicted secreted proteins from the whole *A. algerae* proteome.

Discussion

To date, the available proteomics data on host-parasite interactions are mainly about the host's response to the parasite [4,5,32,33]. Both the low parasite size of intracellular parasites and the low amount of parasite proteins compared to their host cells can explain the difficulty to extract enough parasite proteins from host cells suitable for detection during the kinetics of the host-parasite cross-talk. For the first time the host-parasite cross-talk was investigating in the context of an eukaryotic intracellular parasite using the highly sensitive and quantitative SILAC approach. We identified 148 parasite proteins most of them being detected at 8 dpi. The parasite proteins with known functions were mostly involved in fundamental biological processes and reflect the successfully multiplication of the parasite inside the host. Regarding the host dialogue during the kinetics of *A. algerae* infection, since our model was produced in cell culture, the host cells response to *A. algerae* mainly involved in the innate immune response split in two parts: first the oxidative stress and then the type I interferon response.

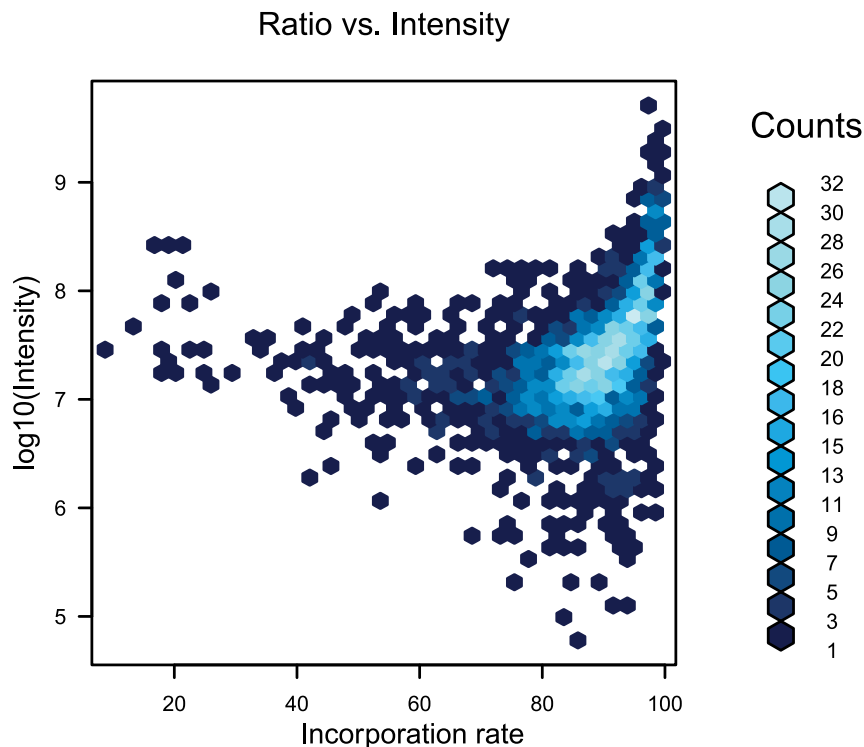


Figure 2. Incorporation rate of stable isotope $^{13}\text{C}_6$ $^{15}\text{N}_2$ -lysine by HFF cells after five cell population doublings. Each hexagon is colored according to the number of proteins in its area of incorporation and intensity. Most of proteins present an incorporation rate above 90%, which is efficient for a good quantification of the protein changes in abundance for both infection and hypoxia treatments. doi:10.1371/journal.pone.0100791.g002

Antioxidant proteins involved in the protection against the oxidative stress induced by the infection

Glutathione-S-Transferase (GST), Superoxide Dismutase 2 (SOD2), and ferritin were strongly modulated in *A. algerae*-infected HFF cells. GST is overexpressed and is part of the classical response to oxidative stress due to the production of reactive oxygen species (ROS) to counter an infection. This had already been observed following an infection of *Aedes aegypti* by the microsporidian species *Vavraia culicis* and *Edhazardia aedis* [34,35]. Conversely, the mitochondrial SOD2 protein was strongly downregulated until 24 hpi, hence questioning its role in the antioxidant system. However, this modulation could also be caused by a strong disturbance of the host mitochondria consecutive to cell infection, as it is known that microsporidia are highly dependent on their host pertaining to their ATP supply [8,10]. A SILAC experiment focusing on mitochondria fraction of infected cells (vs. healthy cells) could be helpful to understand how microsporidia can hijack the host mitochondria metabolism. Another well-known ROS implicated in the innate response is the inducible nitric oxide (iNOS). This ROS is produced by the nitric oxide synthase (NOS) through the L-arginine and L-ornithine pathways which are tightly regulated by different enzymes including the ornithine aminotransferase (OAT) [36]. In our experiment, the OAT but also the N(G),N(G)-dimethyl-arginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1, a NOS inducer) [37] proteins were less abundant during the infection suggesting that the NOS regulation is altered by the infection as it has been observed in several parasitic infections [34,35]. This modulation could be linked to the strong upregulation of the ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 (UCHL1) observed in our experiment. Indeed, it is known that the NOS synthesis is

regulated through the activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) and the UCHL1 protein has been shown to drastically decrease the activation of ERK [38], arguing for an inactivation of the NOS system in *A. algerae*-infected HFF cells.

Interferon response specific to *A. algerae*

In *A. algerae*-infected cells, the IFIT1 (IFIT for Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats), IFIT2, IFIT3 and the interferon-inducible MX1 proteins were dramatically upregulated after 8 dpi, with a log2 ratio upper to 2.5 (Fig. 3, Fig. 5). These four proteins are known to be induced by type I and type III interferons, especially IFN- α/β [39]. Interferons (IFNs) are a family of proteins secreted by host cells in response to infection by various intracellular pathogens such as viruses, bacteria, fungi or protozoa, and involved in the innate immunity. This mechanism is well documented in the case of viral infections, but few studies have described type I interferon production in response to intracellular parasites, as it has been the case for *P. falciparum* [40] or *Listeria monocytogenes* [41]. Once IFN is produced and secreted by the cell, it acts in an autocrine and paracrine loop to stimulate its receptor on both the infected and neighbouring cells (Fig. 5). To explain the late detection of IFN response, the critical mass of infected cells required to detect this auto activation loop might need more than 48 h of infection in our experimental conditions. Proteins involved in cell signaling were also detected as modulated during the infection, especially the proto-oncogene Ras and proteins involved in the JAK-STAT pathway. This pathway has already been shown to be modulated in the case of mice infection by *L. monocytogenes* as a direct consequence of the IFIT-induced system [39]. Following this first step, the extracellular-

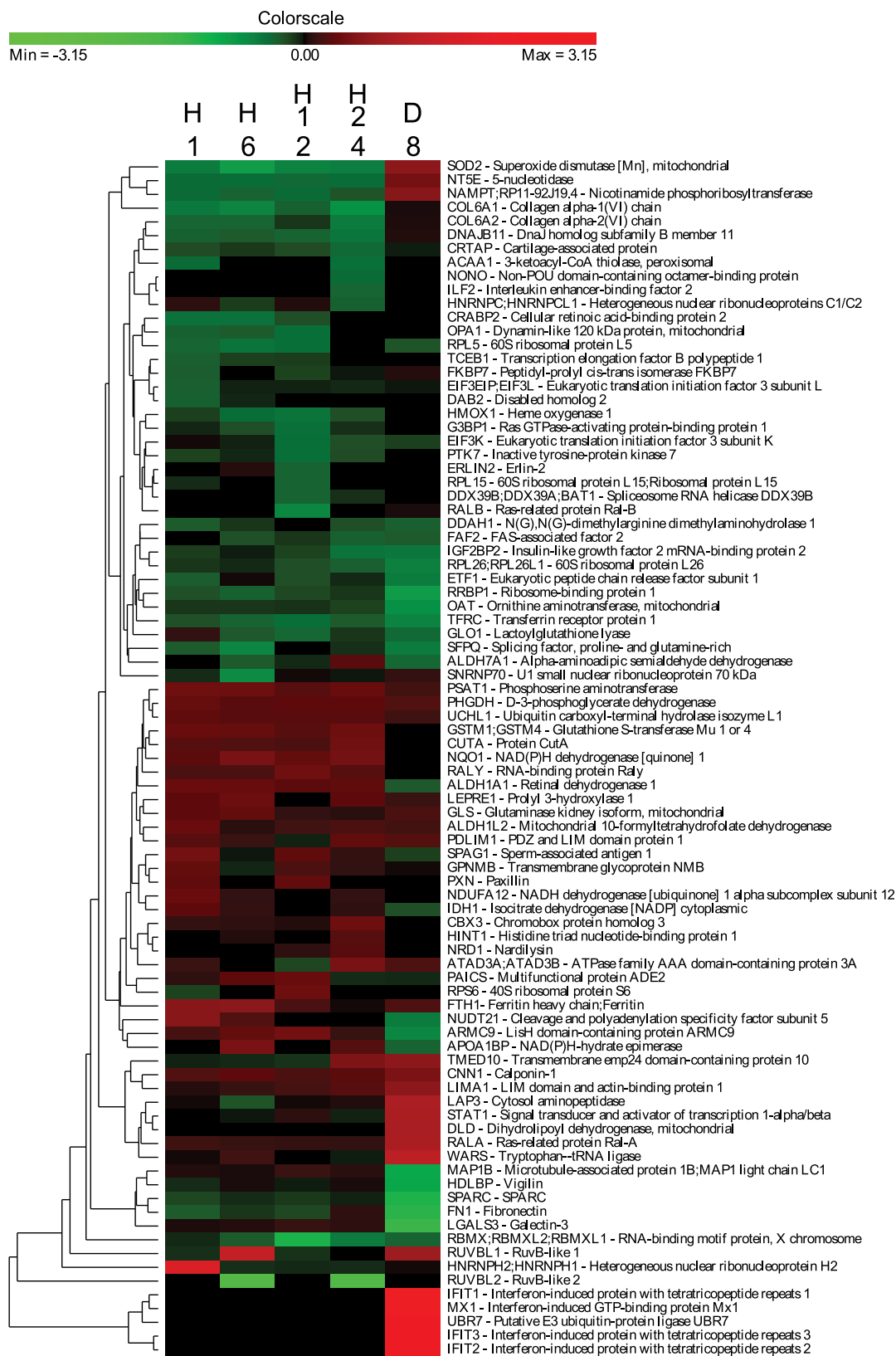


Figure 3. Clusters of the host proteins significantly modulated during the kinetics of infection. HFF cells at confluence were infected by 1×10^6 spores of *A. algerae* and samples were taken 1 hour post infection (H1), 6 hour post infection (H6), 12 hour post infection (H12), 24 hour post infection (H24) and 8 day post infection (D8). Log2 Protein ratio were measured using the SILAC workflow and were relative to the uninfected cells. Genes were selected for this analysis if their expression level differed significantly from the control for at least one time point. The color scale ranges from saturated green for log ratios -3.15 and below to saturated red for log ratios 3.15 and above. Each gene is represented by a single row of colored boxes and each time point is represented by a single column.

doi:10.1371/journal.pone.0100791.g003

produced IFN- β can bind to the Janus Kinase receptor (JAK) leading to the activation of STAT1 (which is upregulated in our experiment) and STAT2. These two proteins form a complex with IRF9 (interferon regulatory factor 9), which translocate into the nucleus and promotes the expression of the IFIT family genes. As previously mentioned, proteins involved in Ras signal transduction were modulated by the infection, suggesting an activation of the pathway. Moreover, Ras signaling impacts numerous functions in the cell including actin cytoskeletal integrity, proliferation, differentiation, cell adhesion, apoptosis, and cell migration.

Among the different altered functions which are linked to the interferon response, a cluster of proteins responsible for transcription and translation is shown to be downregulated at any time of the infection (consistent with a Type I interferon response). Indeed, IFIT1 and IFIT2 are known to directly bind to the EIF3 complex resulting in a suppression of more than 60% of translation in cells [42]. Interestingly, in our experiment, EIF3-l and EIF3-k, two components of the EIF3 complex are downregulated until 6 hpi. We also observed that the 60 S ribosomal protein is strongly down-regulated during the experiment confirming a decrease in protein translation activity.

Nine proteins associated to the cytoskeleton were modulated during the infection suggesting a reorganization of the host cell. Such a cell structure reorganization is well known in the case of red blood cells infected by *P. falciparum* [43]. According to its obligatory parasitic nature, *A. algerae* is highly dependent of its host especially for energy supply [10]. *A. algerae* may be tightly associated with the host mitochondria and a relocalization of mitochondria around the parasitophorous vacuole has been already observed after infection of mammal cells by the microsporidian species *Encephalitozoon cuniculi* [44]. Interestingly, one of our modulated proteins, the microtubule-associated protein 1B (MAP1B), is responsible for the mitochondria transport through the microtubule web [45]. As IFIT2 can interact and modulate the microtubule network [46] we hypothesized that IFIT2 could be implicated in cell reorganization during *A. algerae* infection.

Apoptosis is a classical response to intracellular pathogens especially after viral infection; this phenomenon could also be induced through the IFN response. IFN-induced proteins have the ability to block the cell cycle, promote apoptosis or lead to cell proliferation [47–49]. In our experiment, the effects of infection on the apoptosis process remain unclear given that no direct effector

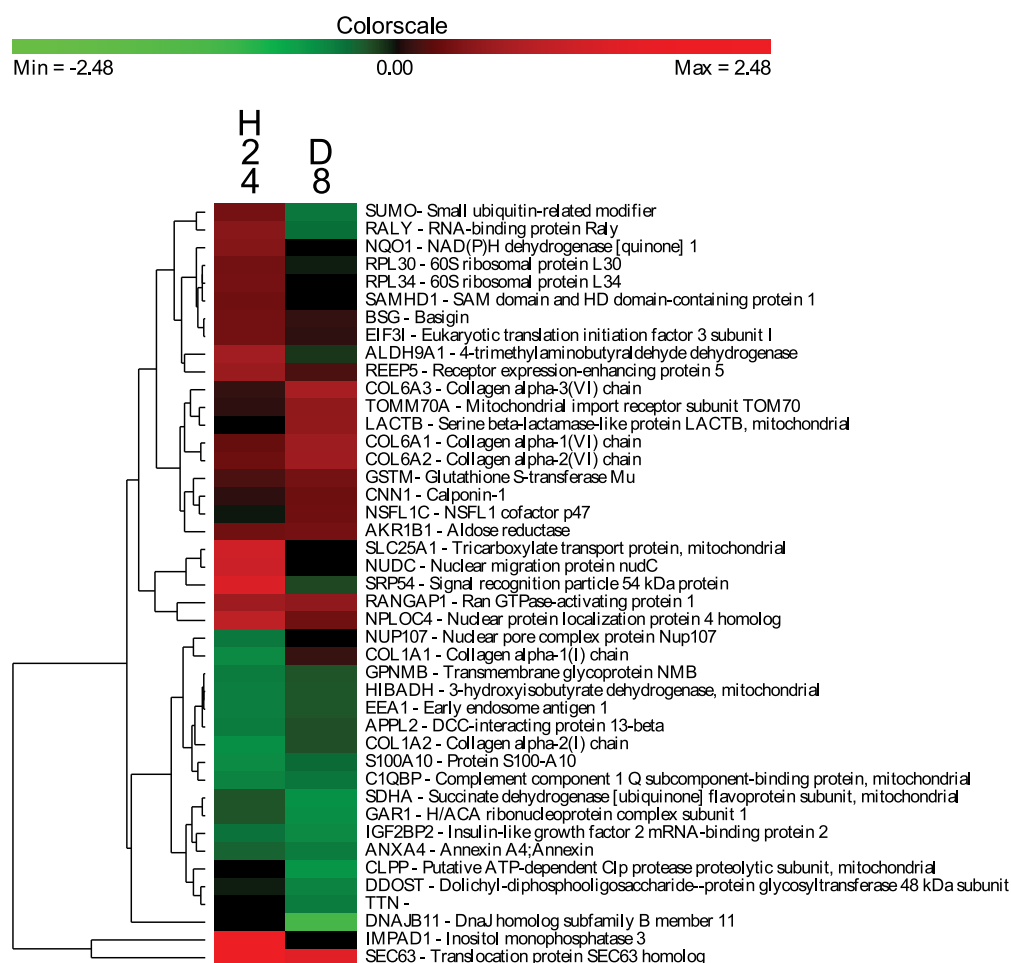


Figure 4. Clusters of the host proteins significantly modulated during the hypoxia treatment. HFF cells at confluence were submitted to an abiotic stress (i.e. hypoxic) at two different cell ages 24 hours (H24) and 8 days (D8). Proteins expression levels were clustered by using methods described here before in Fig S1.
doi:10.1371/journal.pone.0100791.g004

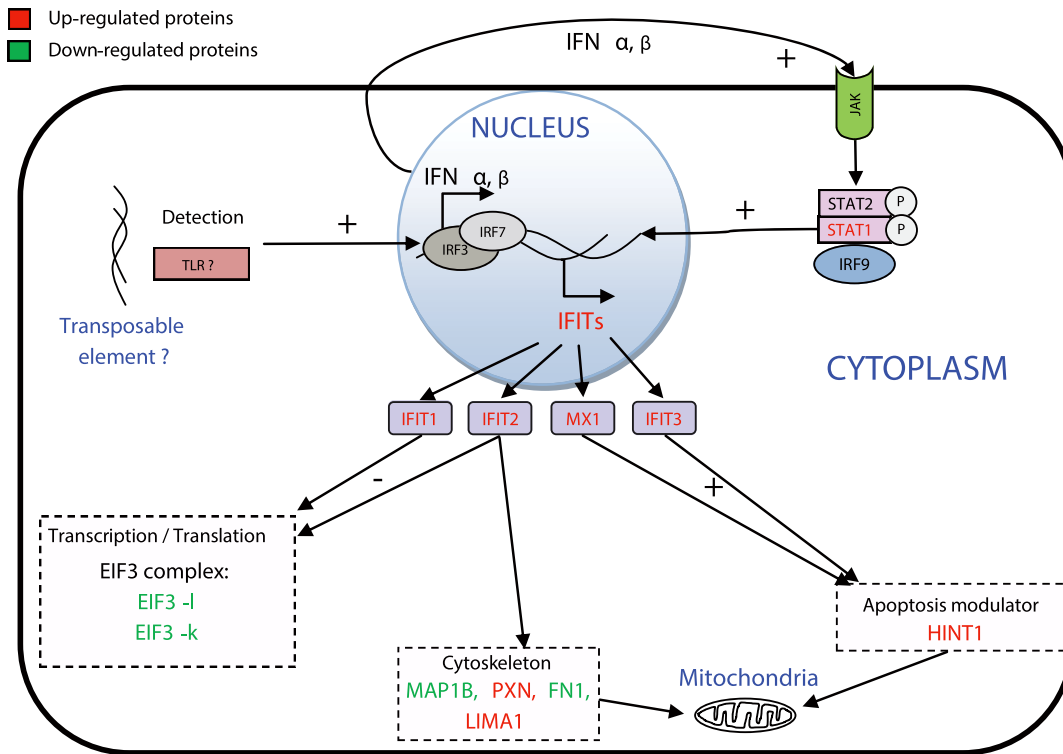


Figure 5. Schematic illustration of the proposed IFN host response against infection with *A. algerae*. Proteins that have been shown to be upregulated during the experiment are indicated in red, the downregulated ones are in green. The dsDNA produced by the TE is recognized by the Toll-like receptor TLR9 which senses CpG DNA. This leads to the activation of IRF3 and IRF7 by phosphorylation, which can bind host genome to stimulate IFN expression. The secreted IFN would then activate the JAK-STAT signaling pathway. The phosphorylated STAT1, STAT2, and IRF9 form the ISGF3 complex, which is translocated into the host nucleus, and thus stimulates IFIT family genes expression. IFIT1 and IFIT2 directly bind eIF3 and suppress transcription. IFIT2 interacts with MITA (Mediator of IRF3 activation), and induces apoptosis via the mitochondrial pathway that is induced by the innate immune response. IFIT2 can also interact with microtubules and could be responsible of cytoskeleton reorganization.
doi:10.1371/journal.pone.0100791.g005

of apoptosis has been detected. Nevertheless, IFIT3 and HINT1, which are tightly upregulated in our experiment, have been shown to induce apoptosis through the mitochondria pathway [48] and an upregulation of P53 and Bak transcription, respectively [50]. Our results therefore suggest an activation of the apoptotic signaling, however, the direct detection of apoptotic processes would be necessary to conclude on this aspect. Despite the oxidative stress and the interferon response are induced during the infection of HFF cells by *A. algerae*, the parasite succeeds in its infection process, meaning that these two arms of the immune system are inefficient or not sufficient enough to counter *A. algerae*.

Predictive host-parasite crosstalk

Among the parasite proteins, we found that 12% are predicted to be secreted. This is intriguing since secreted proteins represent only 5% of the complete *A. algerae* predicted proteome. The overrepresentation of these proteins can have a biological significance as they can be found at the host-parasite interface and may interfere directly with host cellular components. However we cannot exclude that this could be the result of an extraction bias since these secreted proteins are more easily extracted. Unfortunately, the functions of most of these proteins are unknown, and further investigation is still needed to demonstrate their role as potential parasite effectors. To protect itself against host defenses (ROS), the parasite may have an antioxidant system since we detected proteins involved in ROS detoxification (ferritin, thioreductase and superoxide dismutase) (Table S3).

Interestingly, among the parasite proteins, a transposable element was detected (TE)(POL polyprotein), supporting a recent study showing that *A. algerae* genome harbors numerous TEs [16]. Usually the activity of these elements is under regulation of the host, via pre- and post-transcriptional mechanisms [51] which thus makes their proteins difficult to detect. We found one specific microsporidian regulation signal within the putative promoter of this TE, i.e. a GGG-motif before the start codon [16], suggesting a domestication of the TE by the microsporidia, that may have provided an advantage in the evolutive history of *A. algerae*. The domestication of TEs in order to fulfill particular functions for the host organism has been a recurrent event throughout evolution and concerns any type of TEs [52,53]. Host organisms have thus repeatedly recruited both the regulatory and the coding sequences of TEs. These co-optations can be very ancient like the telomere maintenance by TART and HeT-A retrotransposons in *Drosophila* [54], the programmed genome rearrangements of *Paramecium* by a DNA transposon [55]. Ancient co-optation were also showed for the syncytin proteins, derived from the envelope gene of an endogenous retrovirus, which are implied in the placenta formation in mammals [56], or the RAG1 and RAG2 proteins promoting the V(D)J recombination to generate the diversity of immunoglobulins in vertebrates that both derived from a DNA transposon [57]. In the last two cases, the structure of the TE is no more recognizable and the recruited TE sequence has become a new host gene. More recent cases of domestication have also been described like the ENS1/ERN1 protein which is specifically

produced in the embryonic stem cells of chicken and controls the timing of the neural plate emergence, which function is probably restricted to the galliform species and which structure still mainly corresponds to that of a LTR retrotransposon [58,59]. The adaptive advantages of some TE insertions have also been shown to occur quite often in *Drosophila*, some of these events being particularly recent since they took place less than 10,000 years ago [60].

In the case of type 1 IFN response to *L. monocytogenes* infection [41], the detection seems to be mediated by the direct recognition of cytosolic bacterial dsDNA by Toll like receptor 9, which is activated by CpG DNA. Considering this, we hypothesize that this TE could be the cause of the interferon response activation by leading to DNA release, since this protein still has the ability to synthesize dsDNA from RNA with its reverse transcriptase/ribonuclease H (RT) activities. One possible assumption is that the gene coding the POL polyprotein could have been selected during the co-evolution of mammals and *A. algerae* permitting the parasite to invade and grow in mammal host. The interferon response could then be detrimental to the host as it has been observed for intracellular pathogenic bacteria [61], and this could make the case that the interferon response is a parasitic lure strategy against host innate immune system.

Supporting Information

Figure S1 *A. algerae* intracellular developmental stages in the cytoplasm of HFF cells during 8 days-kinetics of infection. H: hours, D: days.
(JPG)

Table S1 Biological process Gene Ontology analysis for each kinetics time points of the host response. Differen-

tially expressed proteins at each time point were annotated with GO Biological Process terms.

(XLSX)

Table S2 Host proteins identified during the kinetics of infection and significance score for each time of the kinetics.

(XLS)

Table S3 Parasite proteins detected during the kinetics of infection.

(XLSX)

Table S4 Host proteins identified in hypoxia experiment and significance scores for each time of the kinetics.

(XLSX)

Tables S5 Correlation (Pearson's coefficient) of the heavy/light protein abundance ratios between the three biological replicates for each time points studied for both stress (i.e. parasite and hypoxia).

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Gwenael LeDortz for helpful comments and assistance in the English corrections and Allan Panek for illustration assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JP HEA DGB. Performed the experiments: JP HEA AM SU ED CT DGB. Analyzed the data: JP HEA SU ED CB AZ NP EP EL DGB. Contributed reagents/materials/analysis tools: JP HEA SU ED FD DGB. Contributed to the writing of the manuscript: JP HEA SU ED CT CB AZ EP EL PP FD DGB.

References

- Lafferty KD, Dobson AP, Kuris AM (2006) Parasites dominate food web links. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 11211–11216.
- Schmid-Hempel P (2011) Evolutionary parasitology???: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics/by Paul Schmid-Hempel. Oxford: Oxford University Press.
- Sibley LD (2011) Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* 240: 72–91. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x.
- Biron DG, Nedelkov D, Missé D, Holzmüller P (2011) Proteomics and host pathogen interactions???: bright future???. In: Tibayrenc M, editor. Genetics and evolution of infectious diseases. Amsterdam: Elsevier. pp. 263–303.
- Biron DG, Loxdale HD, Université C, Pascal UB, Génome M (2013) Host – parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite. *J Exp Biol*: 148–160. doi:10.1242/jeb.073825.
- Capella-Gutiérrez S, Marcet-Houben M, Gabaldón T (2012) Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biol* 10: 47.
- Vávra J, Lukeš J (2013) Microsporidia and the art of living together. In: Rollinson D, editor. Advances in parasitology. Academic Press, Vol. 82. pp. 253–319.
- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, et al. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414: 450–453.
- Belkorchia A, Biderre C, Milon C, Polonais V, Wincker P, et al. (2008) In vitro propagation of the microsporidian pathogen *Brachiola algerae* and studies of its chromosome and ribosomal DNA organization in the context of the complete genome sequencing project. *Parasitol Int* 57: 62–71.
- Texier C, Vidau C, Vignes B, El Alaoui H, Delbac F (2010) Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr Opin Microbiol* 13: 443–449.
- Peyretailade E, Gonçalves O, Terrat S, Dugat-Bony E, Wincker P, et al. (2009) Identification of transcriptional signals in *Encephalitozoon cuniculi* widespread among Microsporidia phylum: support for accurate structural genome annotation. *BMC Genomics* 10: 607.
- Peyretailade E, El Alaoui H, Diogon M, Polonais V, Parisot N, et al. (2011) Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Res Microbiol* 162: 598–606.
- Visvesvara GS, Moura H, Leitch GJ, Schwartz DA, Xiao LX (2005) Public health importance of *Brachiola algerae* (Microsporidia)—an emerging pathogen of humans. *Folia Parasitol (Praha)* 52: 83–94.
- Margos G, Maier WA, Seitz HM (1992) The effect of nosematosis on the development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res* 78: 168–171.
- Kucerova Z, Moura H, Visvesvara GS, Leitch GJ (n.d.) Differences between *Brachiola* (Nosema) *algerae* isolates of human and insect origin when tested using an in vitro spore germination assay and a cultured cell infection assay. *J Eukaryot Microbiol* 51: 339–343.
- Peyretailade E, Parisot N, Polonais V, Terrat S, Denonfoux J, et al. (2012) Annotation of microsporidian genomes using transcriptional signals. *Nat Commun* 3: 1137.
- Biron DG, Moura H, Marche L, Hughes AL, Thomas F (2005) Towards a new conceptual approach to “parasitoproteomics.” *Trends Parasitol* 21: 162–168.
- Wastling JM, Armstrong SD, Krishna R, Xia D (2012) Parasites, proteomes and systems: has Descartes' clock run out of time? *Parasitology* 139: 1103–1118.
- Hughes C, Krijgsvelde J (2012) Developments in quantitative mass spectrometry for the analysis of proteome dynamics. *Trends Biotechnol* 30: 668–676.
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, et al. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1: 376–386.
- Munday DC, Surtees R, Emmott E, Dove BK, Digard P, et al. (2012) Using SILAC and quantitative proteomics to investigate the interactions between viral and host proteomes. *Proteomics* 12: 666–672.
- Petrak J, Ivanek R, Toman O, Cmejla R, Cmejlova J, et al. (2008) Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8: 1744–1749.
- VAVRA J, UNDEEN AH (1970) *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporidia) a Pathogen in a Laboratory Colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). *J Protozool* 17: 240–249.
- Ong S-E, Mann M (2006) A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* 1: 2650–2660.
- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26: 1367–1372.
- Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema R a, Olsen J V, et al. (2011) Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10: 1794–1805.
- Dean CB, Nielsen JD (2007) Generalized linear mixed models: a review and some extensions. *Lifetime Data Anal* 13: 497–512.

28. Dimmer EC, Huntley RP, Alam-Faruque Y, Sawford T, O'Donovan C, et al. (2012) The UniProt-GO Annotation database in 2011. *Nucleic Acids Res* 40: D565–70.
29. Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, et al. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674–3676.
30. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785–786.
31. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35: D61–5.
32. Mehta A, Brasileiro ACM, Souza DSL, Romano E, Campos MA, et al. (2008) Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? *FEBS J* 275: 3731–3746. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06528.x.
33. Patramoel S, Choumet V, Surasombattana P, Sabatier L, Thomas F, et al. (2012) Update on the proteomics of major arthropod vectors of human and animal pathogens. *Proteomics* 12: 3510–3523.
34. Biron DG, Agnew P, Marche L, Renault L, Sidobre C, et al. (2005) Proteome of *Aedes aegypti* larvae in response to infection by the intracellular parasite *Vavraia culicis*. *Int J Parasitol* 35: 1385–1397.
35. Duncan AB, Agnew P, Noel V, Demette E, Seveno M, et al. (2012) Proteome of *Aedes aegypti* in response to infection and coinfection with microsporidian parasites. *Ecol Evol* 2: 681–694.
36. Vincendeau P, Gobert AP, Daulouède S, Moynet D, Mossalayi MD (2003) Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol* 19: 9–12.
37. Kostourou V, Robinson SP, Cartwright JE, Whitley GSJ (2002) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase I enhances tumour growth and angiogenesis. *Br J Cancer* 87: 673–680.
38. Weber B, Schaper C, Wang Y, Scholz J, Bein B (2009) Interaction of the ubiquitin carboxyl terminal esterase L1 with alpha(2)-adrenergic receptors inhibits agonist-mediated p44/42 MAP kinase activation. *Cell Signal* 21: 1513–1521.
39. Zhou X, Michal JJ, Zhang L, Ding B, Lunney JK, et al. (2013) Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense. *Int J Biol Sci* 9: 200–208.
40. Pichyangkul S, Yongvanitchit K, Kum-arb U, Hemmi H, Akira S, et al. (2004) Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J Immunol* 172: 4926–4933.
41. Stetson DB, Medzhitov R (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24: 93–103.
42. Hui DJ, Terenzi F, Merrick WC, Sen GC (2005) Mouse p56 blocks a distinct function of eukaryotic initiation factor 3 in translation initiation. *J Biol Chem* 280: 3433–3440.
43. Prajapati SK, Singh OP (2013) Remodeling of human red cells infected with *Plasmodium falciparum* and the impact of PHIST proteins. *Blood Cells Mol Dis* 51: 195–202.
44. Scanlon M, Leitch GJ, Visvesvara GS, Shaw AP (2004) Relationship between the host cell mitochondria and the parasitophorous vacuole in cells infected with *Encephalitozoon microsporidia*. *J Eukaryot Microbiol* 51: 81–87.
45. Jiménez-Mateos E-M, González-Billault C, Dawson HN, Vitek MP, Avila J (2006) Role of MAP1B in axonal retrograde transport of mitochondria. *Biochem J* 397: 53–59.
46. Saha S, Sugumar P, Bhandari P, Rangarajan PN (2006) Identification of Japanese encephalitis virus-inducible genes in mouse brain and characterization of GARG39/IFIT2 as a microtubule-associated protein. *J Gen Virol* 87: 3285–3289.
47. Motylewska E, Lawnicka H, Kowalewicz-kulbat M, Sicinska P, Niedziela A, et al. (2013) Interferon alpha and rapamycin inhibit the growth of pheochromocytoma PC12 line in vitro Interferon alfa i rapamycyna hamują wzrost linii komórkowej. *Endokrynol Pol* 64: 368–374. doi:10.5603/EP.
48. Stawowczyk M, Van Scoy S, Kumar KP, Reich NC (2011) The interferon stimulated gene 54 promotes apoptosis. *J Biol Chem* 286: 7257–7266.
49. Gomez D, Reich NC (2003) Stimulation of primary human endothelial cell proliferation by IFN. *J Immunol* 170: 5373–5381.
50. Weiske J, Huber O (2006) The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem* 281: 27356–27366.
51. Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8: 272–285.
52. Volff J-N (2006) Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays* 28: 913–922.
53. C (2010) A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics* 186: 1085–1093.
54. Pardue M-L, DeBaryshe PG (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annu Rev Genet* 37: 485–511.
55. Baudry C, Malinsky S, Restituito M, Kapusta A, Rosa S, et al. (2009) PiggyMac, a domesticated piggyBac transposase involved in programmed genome rearrangements in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. *Genes Dev* 23: 2478–2483.
56. Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, et al. (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403: 785–789.
57. Kapitonov V V, Jurka J (2005) RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol* 3: e181.
58. Streit A, Berliner AJ, Papanayotou C, Sirulnik A, Stern CD (2000) Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. *Nature* 406: 74–78.
59. Lerat E, Birot A-M, Samarut J, Mey A (2007) Maintenance in the chicken genome of the retroviral-like cENS gene family specifically expressed in early embryos. *J Mol Evol* 65: 215–227.
60. González J, Lenkov K, Lipatov M, Macpherson JM, Petrov DA (2008) High rate of recent transposable element-induced adaptation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6: e251.
61. Carrero JA (2013) Confounding roles for type I interferons during bacterial and viral pathogenesis. *Int Immunol*.

**CHAPITRE V: ETUDE DU PROTEOME DE L'INTESTIN
D'ABEILLE EN REPONSE A L'INFECTION PAR *NOSEMA*
CERANAE PAR 2D-DIGE**

Nous avons ensuite choisi de passer à un niveau supérieur d'intégration : la réponse de l'hôte au niveau tissulaire. Nous avons pour cela choisi d'étudier les variations d'abondance protéiques dans l'intestin d'abeille infectée par *N. ceranae*. Ce travail a été effectué dans le cadre de l'ANR BEELOSS (2013-2017), dont l'objectif est, entre autres, de caractériser l'impact du parasite *N. ceranae* sur l'homéostasie intestinale de l'abeille domestique.

De toutes les pathologies de l'abeille observées dans le monde, la nosébose est certainement celle qui présente la plus forte prévalence (Fries, 2010). Bien que l'infection par le parasite puisse être asymptomatique (Higes et al., 2010c), plusieurs études réalisées essentiellement en Espagne suggèrent une forte relation de cause à effet entre la présence de *N. ceranae* dans les colonies et leur effondrement (Higes et al., 2009, 2008; Martin-Hernandez et al., 2007). De plus, un effet synergique avec certains pesticides (notamment les néonicotinoïdes et les phénylpyrazoles) a pu être observé et tend à appuyer l'idée d'une implication de ce parasite dans l'effondrement de colonies dans le monde (Alaux et al., 2010; Aufauvre et al., 2012; Vidau et al., 2011). Suite à ce constat, de nombreuses études ont été menées afin d'établir un tableau physiopathologique de l'infection des abeilles par *N. ceranae*. Il est maintenant admis que l'infection affaiblit l'immunité de l'abeille, modifie l'homéostasie hormonale des abeilles déstabilisant ainsi l'organisation de la colonie et provoque un stress énergétique (**Chapitre II.3.2.2.2**). Cependant les stratégies parasitaires utilisées par *N. ceranae* qui pourraient provoquer ces perturbations sont encore très mal connues. De plus, l'impact de l'infection sur la mortalité est encore contesté et de nombreuses études montrent des résultats contradictoires. Notre étude avait ainsi pour but d'apporter de nouvelles données dans la compréhension du dialogue qui s'établit lors de l'interaction entre l'abeille domestique *A. mellifera* et *N. ceranae*, et également de son impact sur la physiologie de l'abeille.

La technique retenue pour mener à bien cette étude a été la 2D-DIGE, une méthode de protéomique différentielle quantitative qui permet un haut degré de précision et de reproductibilité grâce à l'utilisation d'un standard interne. Nous avons donc comparé des triplicats de pools de 6 intestins d'abeilles saines et infectées 10 jours après infection. Les images de gels obtenus ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Decyder qui nous a permis d'identifier les spots protéiques dont l'abondance variait suite à l'infection. Les spots d'intérêts ont ensuite été découpés puis identifiés en spectrométrie de masse.

L'analyse des gels à l'aide de Decyder nous a permis d'identifier 45 spots d'intérêts dont 23 surexprimés et 22 sous-exprimés. 35 de ces spots ont par la suite été découpés et analysés en spectrométrie de masse, menant à l'identification finale de 14 protéines. Une reconstruction des réseaux protéiques impactés par l'infection a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel Cytoscape, dans laquelle nous avons également intégré les gènes qui avaient été détectés comme modulés par l'infection dans l'étude de Dussaubat et al. (2012). Cette reconstruction a fait apparaître 3 grands clusters de protéines impliquées dans le métabolisme, le cytosquelette et enfin le développement et la différenciation cellulaire. De plus, il semblerait que l'infection provoque un stress oxydant (Thioredoxine et GST surexprimées), ce qui fait partie intégrante de la réponse immunitaire connue des insectes et/ou liée au métabolisme (Ryu et al., 2006) et qui avait déjà été observée dans l'étude de Dussaubat et al. (2012). La surexpression de l' α -glucosidase semble indiquer une réponse à un stress énergétique provoqué par l'infection et déjà observé lors d'une étude précédente (Mayack and Naug, 2009). Cette étude nous a conduits à faire l'hypothèse que le stress oxydant conjointement avec le stress énergétique provoqueraient chez l'abeille une dégradation du tissu intestinal. Ainsi, la perturbation du développement de l'épithélium intestinal observée pourrait expliquer la mortalité accrue des abeilles suite à l'infection.



Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions



Cyril Vidau^{a,b,1}, Johan Panek^{a,b,1}, Catherine Texier^{a,b}, David G. Biron^{a,b}, Luc P. Belzunces^c, Morgane Le Gall^{d,e,f}, Cédric Broussard^{d,e,f}, Frédéric Delbac^{a,b}, Hicham El Alaoui^{a,b,*}

^a Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^b CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière, France

^c INRA, UR 406 Abeilles & Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, CS 40509, 84914 Avignon Cedex 9, France

^d Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France

^e CNRS, UMR8104, Paris, France

^f Plateforme de Protéomique 3P5, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 November 2013

Accepted 8 July 2014

Available online 16 July 2014

Keywords:

Honeybee

Nosema

2D-DIGE

Midgut

Host–parasite interaction

ABSTRACT

Many invasive pathogens effectively bypass the insect defenses to ensure the completion of their life cycle. Among those, an invasive microsporidian species, *Nosema ceranae*, can cause nosemosis in honeybees. *N. ceranae* was first described in the Asian honeybee *Apis cerana* and is suspected to be involved in Western honeybee (*Apis mellifera*) declines worldwide. The midgut of honeybees is the first barrier against *N. ceranae* attacks. To bring proteomics data on honeybee/*N. ceranae* crosstalk and more precisely to decipher the worker honeybee midgut response after an oral inoculation of *N. ceranae* (10 days post-infection), we used 2D-DIGE (2-Dimensional Differential In-Gel Electrophoresis) combined with mass spectrometry. Forty-five protein spots produced by the infected worker honeybee group were shown to be differentially expressed when compared to the uninfected group; 14 were subsequently identified by mass spectrometry. *N. ceranae* mainly caused a modulation of proteins involved in three key host biological functions: (i) energy production, (ii) innate immunity (reactive oxygen stress) and (iii) protein regulation. The modulation of these host biological functions suggests that *N. ceranae* creates a zone of “metabolic habitat modification” in the honeybee midgut favoring its development by enhancing availability of nutrients and reducing the worker honeybee defense.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

For many host/pathogen associations, attack of the host is associated with manipulation by the parasite to create a zone of “metabolic habitat modification” that favors the development of the parasite by enhancing nutrient uptake and reducing the host defense response (Biron et al., 2005b; Goethals et al., 2001; Guttman, 2004; Vincendeau et al., 2003). An important aspect of parasite manipulation is changing the carbon and nitrogen metabolism as well as altering key biological functions of the host. For example, microsporidia, a phylum of spore-forming unicellular parasites related to fungi, can impair the immune defenses of the

host midgut and favor the production of host metabolites required for their development (Biron et al., 2005a).

Two microsporidian species are known to infect honeybees: *Nosema apis* (Zander, 1909) and *Nosema ceranae* (Fries et al., 1996). While *N. apis* has been widely described in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (Bailey and Ball, 1991), *N. ceranae* has been recently identified in *A. mellifera* and now represents a major threat in colonies (Heintz et al., 2011; Higes et al., 2008, 2010; Martín-Hernández et al., 2007; Martín-Hernández et al., 2012). Although it was initially considered to be a parasite affecting the Asian honeybee, *Apis cerana*, *N. ceranae* seems to have recently jumped from its primary host to the Western honeybee. The first detection of *N. ceranae* in *A. mellifera* was reported in 2006 and coincided with massive honeybee colony losses in Europe (EFSA, 2008) and North America (vanEngelsdorp et al., 2007, 2008), explaining why its involvement was rapidly investigated by the scientific and bee-keeping communities. Since then, DNA-based molecular diagnostic techniques have been developed, and an increasing number of

* Corresponding author at: CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière, France. Fax: +33 4 73 40 76 70.

E-mail address: hicham.el_alaoui@univ-bpclermont.fr (H. El Alaoui).

¹ These authors contributed equally to this work.

infected colonies have been monitored globally (Suwannapong et al., 2011). Some studies have shown that the colony infection rate can increase to 70% (Chauzat et al., 2007; Traver and Fell, 2011). However, conflicting data concerning the pathogenicity of *N. ceranae* prevent us from defining the risk associated with infection, as this parasite has been found in both healthy and weakened honeybee colonies (Cox-Foster et al., 2007).

Several investigations on the physiopathological changes induced by *N. ceranae* have been conducted. The major disturbances described in infected honeybees are energetic stress (Alaux et al., 2010; Mayack and Naug, 2009), behavioral fever (Campbell et al., 2010; Dussaubat et al., 2013), hormonal disturbance (Dussaubat et al., 2010; Holt et al., 2013), immunity depletion (Alaux et al., 2010; Antunez et al., 2009) and a decrease in the insect lifespan (Alaux et al., 2010; Aufauvre et al., 2012, 2014; Goblirsch et al., 2013; Higes et al., 2008; Vidau et al., 2011). Some of these perturbations, such as hormonal disturbance (Down et al., 2008; Karlhofer et al., 2012; Seleznev, 2003), energetic stress (Hoch et al., 2002; Rivero et al., 2007) and reduced longevity (Koella et al., 2009), seem to be common features among insect–microsporidia associations. In addition, recent studies suggest that *N. ceranae* can sensitize the honeybees to chemical stressors and vice versa (Alaux et al., 2010; Aufauvre et al., 2012, 2014; Pettis et al., 2012; Retschnig et al., 2014; Vidau et al., 2011; Wu et al., 2012) and can reduce the efficiency of acaricide treatment against *Varroa destructor* (Botías et al., 2012), a major threat for honeybees.

While the midgut is the primary site of *N. ceranae* proliferation and plays important roles in immunity, digestion and detoxification in insects, there are few descriptive data on molecular cross-talk induced by this intracellular invasive pathogen during the infection process. Only a few studies exploring the honeybee midgut response to *N. ceranae* infection by transcriptomic approaches are available (Aufauvre et al., 2014; Dussaubat et al., 2012; Holt et al., 2013). In our study, we investigated this response at the proteomic level. By using 2D-DIGE (2-Dimensional Differential In Gel Electrophoresis) combined with mass spectrometry, we tested the assumption that an invasive parasite like *N. ceranae* can alter the expression of the host midgut proteome to create a zone of “metabolic habitat modification”, thereby enhancing the success of its invasion. This survey provides new data concerning the honeybee response to the gut parasite *N. ceranae*.

2. Materials and methods

2.1. Honeybee rearing and *N. ceranae* inoculation

Experiments were performed using honeybees from an *A. mellifera* colony. Two frames of sealed brood were placed in an incubator in the dark at 35 °C, 80% RH. Emerging honeybees were collected, confined to laboratory cages (Pain type) in groups of 30 and maintained in the incubator until inoculation with spores (1 h). During this time, the caged honeybees were supplied *ad libitum* with sterile water and pollen (free of *Nosema*). Honeybees were then individually infected by feeding with 2 µL of sweetened water (50% honey/50% water) containing 125,000 spores of *N. ceranae* that were freshly purified according to Vidau et al. (2011). Control honeybees were individually fed with 2 µL of sweetened water without any *N. ceranae* spores. Three cages of each treatment group (e.g., *N. ceranae*-infected and uninfected honeybees) were maintained in separated incubators in the dark at 33 °C, 80% RH. A small piece of wax (5 × 8 cm) and a 5 mm piece of Beeboost® (Phero Tech, Inc., Canada) that releases five queen mandibular pheromones were placed in each cage to simulate the hive environment. During the first five days, the honeybees were supplied

ad libitum with pollen and 50% (w/v) sugar syrup. Then, honeybees were fed *ad libitum* with 50% (w/v) sugar syrup supplemented with 1% (w/v) proteins (Provita'bee, Biové laboratory). The feeders were replaced daily. Throughout the experiment, each cage was checked daily, dead honeybees were removed and the mortality was recorded.

2.2. Honeybee sampling and midgut dissection

Ten days post-infection (10 dpi), six honeybees from each cage (*N. ceranae*-infected and uninfected) were anaesthetized with CO₂ and then sacrificed by decapitation. The intestinal tract was dissected, and the midgut was separated from the rectum and Malpighian tubules. Midgut tissues were immediately pooled from all six honeybees, frozen in liquid nitrogen and stored at –20 °C until protein extraction. Parasites contained in the rectum were washed with PBS and counted using a hemocytometer chamber.

2.3. Protein extraction

We used the protocol developed by Parker et al. (2010) to prevent proteolysis during protein extraction. Briefly, midgut tissues were disrupted using a bead-beater in 600 µL ice-cold solution containing 15% (w/v) trichloroacetic acid and 1% (w/v) dithiothreitol (DTT) for 2 pulses of 2 min at 35 Hz. After 30 min on ice, precipitated proteins were collected by centrifugation at 16,000g for 15 min at 4 °C, and the protein pellet was washed 3 times with ice-cold acetone. Washed pellets were dried and solubilized in buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 50 mM DTT]. An additional centrifugation step at 16,000g for 5 min at 4 °C was carried out to eliminate insoluble material. Supernatants containing soluble proteins were treated with a 2D Clean-Up kit (GE Healthcare). The proteins were then re-suspended into solubilization buffer without DTT, and the pH was set at 8.5 with 1.5 M Tris-base. Samples were subjected to a protein assay with the Bradford reagent (Bio-Rad), and their protein concentration was further adjusted to 2.5 mg/mL. Finally, protein normalization and quality were controlled by SDS–PAGE.

2.4. 2D-DIGE (2 Dimensional-Differential In Gel Electrophoresis) analysis and protein identification by mass spectrometry (MS)

2D-DIGE is a powerful quantitative approach for comparative analysis of protein abundance owing to its high degree of accuracy and reproducibility (Tonge et al., 2001; Ünlü et al., 1997). Three independent biological replicates of *N. ceranae*-infected honeybees and uninfected honeybees were prepared as described above and resolved by 2D-DIGE. Three gels were run, each containing one midgut protein sample from *N. ceranae*-infected honeybees (50 µg) and one from uninfected honeybees (50 µg), labeled either with Cy3 or Cy5 fluorescent dyes, and one from the internal standard (50 µg), labeled with Cy2 fluorescent dye, following the manufacturer's recommendations (GE Healthcare). The internal standard (IS) was prepared from a pool of equal amounts of proteins from the three *N. ceranae*-infected honeybee samples and the three uninfected honeybee samples used in this experiment. Two-dimensional gel electrophoresis was performed as previously described (Görg et al., 2000). A spot was considered as differentially expressed between *N. ceranae*-infected honeybees and uninfected honeybees when the fold-change of the protein spot abundance was higher than +1.5 or lower than –1.5 and if *t*-test *p*-values were less than 0.05. Two semi-preparative 2D-gels (containing infected or uninfected honeybee protein extracts) and protein identification by MS were performed using the protocol described previously (Kahn et al., 2011).

2.5. Database searches

Database searches were carried out using Mascot version 2.2 (MatrixScience, London, UK) via GPS explorer software (ABSciex) version 3.6 combining MS and MS/MS inquiries on “Other meta-zoa” proteins from NCBI nr databank containing 724,988 sequences (February 2011) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The search parameters were as follows: carbamidomethylation as a variable modification for cysteines, and oxidation as a variable modification for methionines. Up to 1 missed tryptic cleavage was tolerated, and a mass accuracy tolerance of 30 ppm for precursors and 0.3 Da for fragments were used for all tryptic mass searches. Positive identification was based on a Mascot score above the significance level (i.e., <5%). The reported proteins were those with the highest number of peptide matches. Under our identification criteria, no result was found to match to multiple members of a protein family.

2.6. Protein network reconstruction

The composite functional association network was generated with GeneMania (<http://www.genemania.org>) using the *Drosophila* orthologs of (i) the bee proteins identified in our study and (ii) the genes identified by Dussaubat et al. (2012) that are differentially expressed after *N. ceranae* infection. The algorithms underlying the bioinformatic tools consisted of a linear regression-based algorithm that calculated a single composite functional association network from multiple data sources. In GeneMania, only the physical network option (protein–protein interaction data) was selected among the available data on *Drosophila* (Mostafavi et al., 2008). Cytoscape (version 2.8.3) was used to display the networks, and the first neighbors of the differentially expressed proteins were retained in our study (Smoot et al., 2011).

3. Results

3.1. 2D-DIGE analysis

To statistically analyze the proteomic changes induced in the midgut of honeybees infected by *N. ceranae*, a 2D-DIGE experiment was designed from two sets of independent biological triplicates (i.e., infected versus uninfected bees). The honeybees were heavily infected, as an average of 2.6×10^7 spores of *N. ceranae* were

counted in each rectum and we observed 13% mortality 10 days after inoculation and 30% mortality 16 days after. Fig. 1 shows a 2D-DIGE gel with analysis of the variation in midgut proteins 10 days after inoculation with *N. ceranae*. A total of 2140 protein spots were detected on the master gel. Using the DeCyder Biological Variation Analysis (BVA) module, 45 spots were identified as differentially expressed between midguts of healthy and infected honeybees, using a threshold of 1.5-fold change and a *p*-value lower than 0.05, calculated with Student's *t*-test. Of the 45 spots, 23 spots were up-regulated and 22 spots were down-regulated in protein extracts of *N. ceranae*-infected honeybees (Fig. 1, and Table 1).

3.2. Identification of proteins by mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF)

Of the 45 spots of interest, 35 spots could be localized on semi-preparative gels, and they were subsequently analyzed by MS/MS. Proteins were successfully identified from 27 spots, and of these, 9 spots contained at least 2 different proteins (spots 8, 11, 13, 33, 37, 39, 40, 41 and 43, see Table 1), which prevented determination of which proteins varied. The 18 remaining protein spots revealed 14 different candidate proteins; some proteins were found in two or three spots. The modulated proteins are involved in energy production (Major royal jelly protein 1, 2 and 3, α -glucosidases II and III, NADH dehydrogenase 1 subunit 5), in antioxidant defenses (thioredoxin-like 2 and glutathione-S-transferase), in protein regulation (proteasome component C8 and acyl-protein thioesterase 2) and in other functions (Vacuolar-proton ATPase subunit B, Annexin IX CG5730-PC, isoform C isoform 2, beta-1 tubulin, CG3734-PA and CG31974-PA).

3.3. Prediction of honeybee protein networks altered by *N. ceranae* infection

We explored whether the modulated proteins detected in our study were found within the functional networks of genes shown to be altered by *Nosema* in the bee gut and identified by Dussaubat et al. (2012). The network analysis was performed by testing the *Drosophila* orthologs of all the modulated proteins, even those that we found in the same spot (Table 1), using GeneMania, which determines whether genes are connected through physical protein interactions based on a large set of functional association data. Then we selected only proteins that directly interacted with

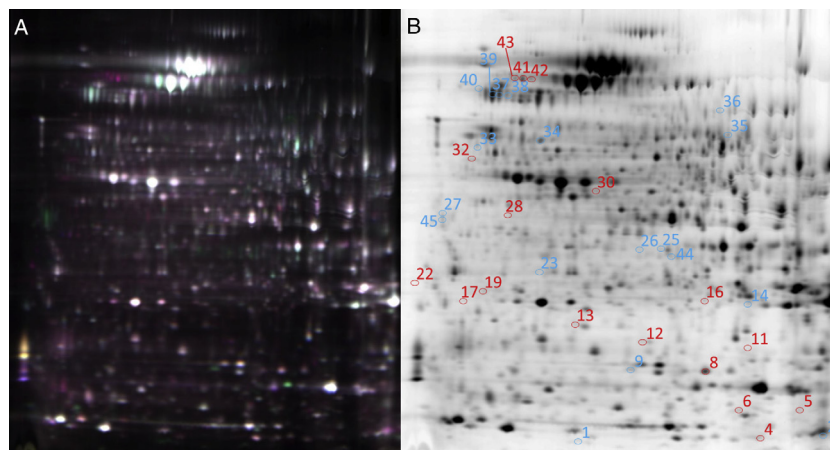


Fig. 1. 2D-DIGE analysis of midgut proteomes from *Nosema ceranae*-infected and healthy honeybees: synthetic gel obtained by DeCyder (A), localization of cut spots (B). The circles indicate the differentially expressed proteins spots that were analyzed by mass spectrometry. Red circles correspond to up-regulated spots and blue circle correspond to down-regulated spots 10 days after infection by *N. ceranae*. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Identified proteins that are differentially expressed in the midguts of *N. ceranae*-infected honeybees.

Protein description	Accession number	Spot n°	Spot abundance		Physical and chemical protein parameters		MS/MS identification	
			p-Value ^a	Fold change ^b	pl theo/exp	MM theo/exp	Peptide identification ^c	Coverage (%) ^d
<i>Energy production</i>								
Major royal jelly protein 2 precursor (MRJP2)	gi 58585108	1	0.0099	−3.6	6.8/5.5	51/11	1/2	5
		25	0.0048	−3.0	6.8/6.8	51/32	6/6	15
		26	0.0059	−2.4	6.8/6.4	51/32	4/5	13
Major royal jelly protein 1 (MRJP1)	gi 58585098	9	0.0067	−3.0	5.1/6.3	49/16	6/8	22
		27	0.0081	−8.4	5.1/3.8	49/38	8/12	36
Major royal jelly protein (MRJP3)	gi 288872651	44	0.027	−2.1	6.7/6.9	62/30	7/9	20
Alpha-glucosidase III	gi 58585164	38	0.0031	−2.0	5.1/4.4	66/75	14/17	42
Alpha-glucosidase II	gi 94400901	42	0.0057	1.9	5.8/4.8	67/82	6/12	27
PREDICTED: similar to CG6463-PA NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	gi 48120572	6	0.0012	1.6	8/8.3	14/13	4/5	49
<i>Antioxidant proteins</i>								
PREDICTED: similar to thioredoxin-like 2	gi 48103506	19	0.0028	1.5	5.1/4.3	25/25	2/2	12
Glutathione S-transferase S1	gi 237681308	22	0.0065	2.4	8.8/3.6	24/27	2/2	11
<i>Protein regulation</i>								
PREDICTED: similar to CG18815-PA, isoform A thioesterase 1	gi 48101936	16	0.0066	2.5	7.1/7.6	24/23	4/4	22
PREDICTED: similar to proteasome subunit alpha type 3 (proteasome component C8)	gi 48096769	23	0.007	−1.6	5.7/4.8	28/28	5/9	35
<i>Other functions</i>								
PREDICTED: similar to Vacuolar H ⁺ -ATPase 55kD B subunit CG17369-PB, isoform B	gi 66531434	34	0.0049	−1.5	5.4/4.9	55/58	15/22	62
PREDICTED: similar to beta-1 tubulin, partial [nasonia vitripennis]	gi 156538985	32	0.0038	2.6	5.5/4.1	37/52	3/9	37
PREDICTED: similar to Annexin IX CG5730-PC, isoform C isoform 2	gi 66530527	45	0.044	−2.2	4.6/3.8	36/36	3/9	29
PREDICTED: similar to CG31974-PA	gi 110749004	30	0.0062	2.1	5.5/5.7	48/44	4/10	27
<i>Spots containing at least 2 different proteins or with uncertain identification</i>								
PREDICTED: similar to CG3734-PA	gi 110749179	36	0.0028	−1.6	6.6/7.9	55/68	1/3	10
PREDICTED: similar to CG9380-PA, isoform A: N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and (PREDICTED: similar to CG5255-PA serine protease) or PREDICTED: similar to CG13321-PA farnesol acid O-methyl transferase, partial	gi 110761202 and gi 48095159 or gi 110768518	8	0.00048	1.5	7 and 5.4 or 7/7.6	13 and 16 or 13/16	5/7 and 1/2 or 4/7	85 and 13 or 85
PREDICTED: similar to CG9380-PA, isoform A N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and peptidoglycan recognition protein L and PREDICTED: similar to CG5255-PA serine protease	gi 110761202 and gi 48095159	11	0.0046	1.5	/6.4 and 7.6/8.4	83 and 28/18	4/6 and 2/4	11 and 22
Glucose oxidase and PREDICTED: similar to thioredoxin peroxidase 1 CG1633-PA, isoform A isoform 1	gi 58585090 and gi 66548188	13	0.0074	1.8	6.5 and 5.6/5.3	68 and 22/20	2/7 and 2/2	17 and 12
ATP synthase subunit beta, putative and major royal jelly protein 1	gi 242023574 and gi 58585098	33	0.00057	−4.5	5.1/4.2	59 and 49/57	7/12 and 4/4	30 and 12
Alpha-glucosidase precursor and heat shock protein cognate 4	gi 58585164 and gi 229892210	37	0.00054	−2.4	5.1 and 5.4/4.3	66 and 71/75	13/22 and 5/10	55 and 20
Heat shock protein cognate 4 and alpha-glucosidase	gi 89885579 and gi 229892210	39	0.0032	−2.1	5.4 and 5.1/4.3	71 and 66/76	5/12 and 11/15	24 and 37
Alpha-glucosidase and heat shock protein cognate 4	gi 89885579 and gi 229892210	40	0.0024	−1.6	5.1 and 5.4/4.2	66 and 71/77	2/5 and 7/12	13 and 24
Hypothetical HSP70 (<i>N. ceranae</i>) and alpha-glucosidase	gi 300705607 and gi 94400901	41	0.0011	4.2	5.3 and 5.8/4.7	74 and 67/82	5/20 and 2/9	41 and 18
Actin related protein 1 or hypothetical HSP70 (<i>N. ceranae</i>) and (alpha-glucosidase)	gi 297591985 or gi 300705607 and gi 94400901	43	0.007	3.1	5.3 or 5.3 and 5.8/4.6	42 or 74 and 67/82	3/7 or 5/18 and 1/10	26 or 36 and 21

^a p-value Student's t-test was based on the log of the ratio between infected and healthy bees.

^b Fold change of protein expression between midgut proteins from infected bees compared to healthy ones.

^c Peptide identification corresponds to the number of peptides identified by MSMS/by MS + MSMS searches.

^d Coverage (%) corresponds to the percentage of sequence coverage.

our modulated proteins. Interestingly, 9 of the modulated proteins were connected with the network identified by Dussaubat et al. (2012). The corresponding honeybee proteins are given in Fig. 2. The glutathione S-transferase GstS1, involved in oxidative stress, clusters within a network that also includes the Vha55 proton-transporting ATPase, the ATPsyn- β ATP synthase and the Prosalpha7 endopeptidase, which are involved in energy metabolism (Fig. 2). This first cluster is closely related to one involved in insect development that includes 2 proteins shown to be modulated in our study: the Anxb11 and the CG13321 proteins. Finally, the actin, the heat shock cognate 4 and β -tubulin proteins that were identified in our study are connected with proteins involved in cytoskeleton modification within a third cluster. It is noteworthy that the three clusters highlighted three closely linked biological processes, i.e., (i) energy metabolism/oxidative stress, (ii) development and (iii) the cytoskeleton.

4. Discussion

In this study, we focused on molecular changes induced in the midgut of honeybees infected by *N. ceranae* using 2D-DIGE combined with mass spectrometry. This useful proteomics tools allowed us to compare the differential abundance of more than 2000 protein spots (i.e., functional biomarkers) from the midguts of infected and uninfected honeybees to test the assumption that *N. ceranae* can alter the expression of the honeybee midgut proteome to create an environment favorable for parasite development.

N. ceranae-infected bees were previously shown to exhibit an energetic stress associated with both behavioral and physiological changes. Mayack and Naug (2009) first showed that in response to *N. ceranae* infection, honeybees displayed a higher level of hunger and increased their food consumption. Thereafter, consistent with these data, Naug and Gibbs (2009) showed that infected bees were less likely to share their food with other bees. Our proteomic data provide molecular candidates supporting the data on energetic stress experienced by *N. ceranae*-infected honeybees. Indeed, our investigations reveal that 4 proteins involved in energy supply, MRJP1, MRJP2, MRJP3 and α -glucosidase III, are less abundant in the midgut of *N. ceranae*-infected bees (Table 1). MRJPs are storage proteins synthesized and secreted by the hypopharyngeal glands to feed larvae and the queen (Schmitzová et al., 1998). A few studies have also reported the presence of MRJPs in the hemolymph (Chan et al., 2009) and brain (Garcia et al., 2009; Peixoto et al., 2009) of honeybees. In this study, some protein spots contained fragmented MRJPs, suggesting that a part of these proteins have undergone a proteolytic process in the midgut lumen, as we controlled the quality of our protein samples and avoided degradation owing to technical factors. Moreover, the decrease in MRJP abundance is accompanied by a decrease in α -glucosidase III, another protein specifically expressed in the hypopharyngeal glands of nurse bees and typically involved in sucrose hydrolysis (Kubota et al., 2004). Both MRJPs and α -glucosidase III may have been transmitted by trophallaxis between caged honeybees. Thus, we assume that their decreased abundance reflects pathological effects induced by *N. ceranae* infection at the hypopharyngeal gland and trophallaxis levels. This assumption is supported by studies showing that *N. ceranae* infection induces the atrophy of hypopharyngeal glands (Alaux et al., 2010), an impoverishment of hypopharyngeal gland secretion (Liu, 1990) and a decrease of trophallactic exchanges (Naug and Gibbs, 2009). However, the parasite was not detected in the hypopharyngeal glands (Huang and Solter, 2013) suggesting an indirect effect of the infection. Targeted studies on pathological effects of *N. ceranae* at the hypopharyngeal level must be conducted to confirm this hypothesis.

The energy requirement of *N. ceranae*-infected bees is also reflected at the midgut level by an increased abundance of proteins involved in carbohydrate catabolism (α -glucosidase II) and energy transfer (NADH dehydrogenase 1 α -subcomplex subunit 5) (Table 1). α -Glucosidase II has been detected in the midgut and hemolymph of honeybees (Kubota et al., 2004). The higher abundance of α -glucosidase II in the midgut suggests a promotion of carbohydrate digestion to provide more energetic substrates to infected bees. Moreover, the higher abundance of NADH dehydrogenase 1 α -subcomplex subunit 5 in the midgut reinforced the idea that carbohydrate catabolism is accelerated to sustain ATP production in parasitized midguts, as microsporidia can take up ATP from the host cell (Texier et al., 2010). Huang et al. (2013) demonstrated that fumagillin (an antibiotic) fails to eliminate *N. ceranae* and may even induce parasite proliferation at some concentrations. These authors showed that the energetic metabolism is modulated by fumagillin and can favor the development of *N. ceranae*. Some of the proteins identified by Huang et al. (2013) are the same as those identified in our study, supporting the fact that *N. ceranae* can hijack the host's energy metabolism to its benefit.

Our data also suggest that infected honeybees undergo oxidative stress because antioxidant proteins (thioredoxin-like 2 and glutathione-S-transferase (GST)) were found to be more abundant in the midgut of infected bees (Table 1). It is known that both bacterial challenges and parasite infections induce the release of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), which are components of the cellular immune response of insects (Ha et al., 2005; Nappi et al., 1995; Rivero, 2006; Ryu et al., 2006). However, extensive ROS production may contribute to host death, as has been shown for *Anopheles gambiae* infected by bacteria and *Plasmodium* (Molina-Cruz et al., 2008). Thus, increased antioxidant proteins are a response to the elevated levels of radical species and protect host cells during the immune response when excess ROS are released, as is the case during gut infection in *Drosophila* (Ha et al., 2005) and *A. gambiae* (Molina-Cruz et al., 2008). Although no study has been designed to investigate whether ROS and RNS are generated during *N. ceranae* infection, it is likely that honeybees use these reactive species to counteract the development of *N. ceranae*. This is in agreement with data from previous studies showing that GST activity was higher in the midgut and fat body of *N. ceranae*-infected bees (Dussaubat et al., 2012; Vidau et al., 2011) and that antioxidants were mobilized in *N. ceranae*-infected honeybee queens (Alaux et al., 2010). Moreover, the epithelial cell degeneration and extensive lysis observed in honeybees infected naturally and experimentally by *N. ceranae* (Higes et al., 2007) may result from an oxidative injury that the antioxidant system cannot counteract during a chronic infection. It would be interesting to test this hypothesis in *Nosema*-infected honeybees, as it could reveal mechanisms involved in epithelial cell degeneration. In this way, the lower abundance of an annexin IX ortholog in the midgut of *N. ceranae*-infected bees suggests that cell degeneration occurs via programmed cell death because a decrease in this protein was associated with the progression of programmed cell death in *Bombyx mori* (Kaneko et al., 2006; Tsuzuki et al., 2001). It has been reported that honeybees infected with *Nosema* spp. have a shorter lifespan in the field and in experimental conditions (Alaux et al., 2010; Aufauvre et al., 2012; Higes et al., 2008; Vidau et al., 2011). This suggests that the reduced longevity observed in caged bees could be strongly linked to the severe cellular damages induced at the intestinal level by starvation imposed by *Nosema* development (Mayack and Naug, 2009). It is conceivable that the degeneration of epithelial ventricular cells and subsequent longevity reduction could also be linked to oxidative stress triggered by *N. ceranae* infection.

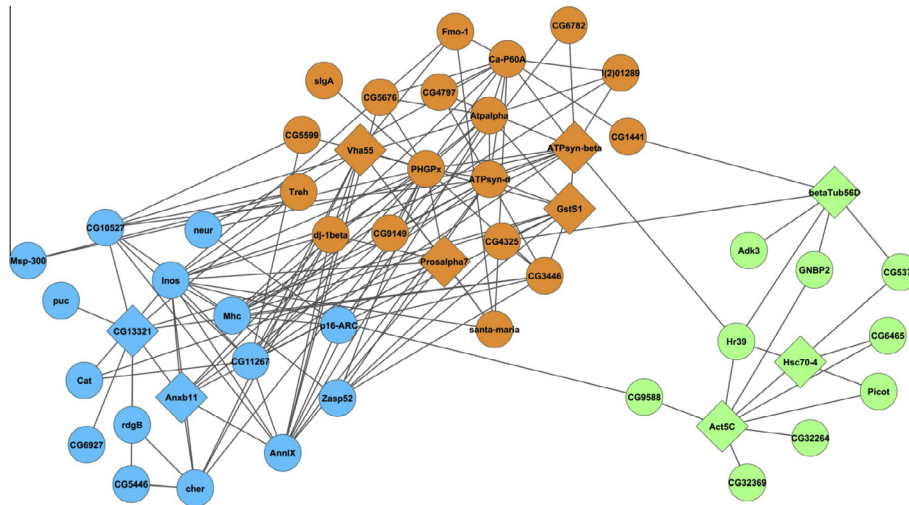


Fig. 2. Network of genes and proteins modulated by *N. ceranae* in the honeybee midgut. The composite functional association network derived from proteomic data sources was generated with GeneMania using the *Drosophila* orthologs of bee genes. Physical interactions between genes are indicated by solid lines. Diamonds and circles represent, respectively, proteins (our study) and genes (Dussaubat et al., 2012) that are differentially expressed after *N. ceranae* infection. Proteins involved in metabolic process and oxidative stress are indicated in orange; blue was chosen for proteins involved in development, and green was chosen for cytoskeleton-related proteins. The honeybee orthologs of *Drosophila* proteins are indicated below. GstS1: ortholog of the glutathione S-transferase S1, Vha55: ortholog of the vacuolar ATPase, ATPsyn-β: ortholog of the ATP synthase, Prosalph7: ortholog of the Proteasome subunit alpha type 3, Anxb11: ortholog of the Annexin IX, CG13321: ortholog of the farnesic acid O-methyl transferase, betaTub56D: ortholog of the beta-1 tubulin, Hsc70-4: ortholog of the heat shock protein cognate 4, Act5C: ortholog of the actin related protein 1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

5. Conclusion

Our proteomic approach allowed us to identify proteomic changes in the midgut of *N. ceranae*-infected honeybees that reflect, on a molecular level, pathological symptoms associated with nosemosis. These data are complementary to the transcriptomic data reported by [Dussaubat et al. \(2012\)](#), as we can observe modulation of proteins that are not expressed in the midgut (i.e. MRJP proteins and α -glucosidase III) and confirm at the proteomic level the biological processes altered by *N. ceranae* in the previous study ([Dussaubat et al., 2012](#)). The reconstructed network based on both transcriptomic and proteomic data strongly suggests that the oxidative response to the infection and the higher energetic demand have a negative impact on infected honeybee development ([Fig. 2](#)) and may cause a lifespan reduction. Indeed, we believe that to cope with the development of *N. ceranae* and compensate for the hijacking of ATP by the parasite, honeybees attempt to increase their carbohydrate uptake by increasing both their food consumption and their digestive capacities. However, intestinal lesions caused by *N. ceranae* proliferation may decrease the absorptive capacity of honeybees and generate starvation symptoms such as impoverishment of hypopharyngeal protein secretions. In addition, to counter the stress imposed by *N. ceranae*, infected honeybees deploy an enzymatic arsenal to protect them against oxidative injuries. It is not clear whether oxidative stress is intrinsically a contributing factor to the reduced lifespan of infected honeybees, but it is known that it contributes to the sensitization of organisms to additional stress. In the same vein, [Di Pasquale et al. \(2013\)](#) have shown that the quality of pollen influences the tolerance of honeybees to *N. ceranae*, as pollen nutrition increases the survival *N. ceranae*-infected bees. The authors have linked this positive influence to the high protein content, antioxidant capacities and high lipid content of pollen sources, arguing for a high impact of nutritional factors on *N. ceranae* tolerance by counterbalancing the negative effect of the parasite on energy metabolism and the antioxidant system.

The data generated by transcriptomic and proteomic tools need to be combined with data from biochemical and metabolomic

approaches, protein interaction studies, and functional approaches to enable the deciphering of the host–parasite interactome and provide a better understanding of honeybee nosemosis.

Acknowledgments

We would like to thank Philippe Chafey (Institut Cochin, Paris) for his help in the DIGE experiments, Sylvie Tchamitchian and Jean-Luc Brunet for their support in the experimental infections. This work was funded by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, MIE: Maladies Infectieuses et Environnement). C.V. acknowledges the support of a Fellowship from the CNRS. J.P. was supported by grants from the "Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

References

- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M., 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11, 2284–2290.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Vignes, B., Belzunces, L.P., Delbac, F., Blot, N., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2, 326–333.
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., Blot, N., 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One* 9, e91686.
- Bailey, L., Ball, B.V., 1991. Honey Bee Pathology. Academic Press.
- Biron, D.G., Agnew, P., Marche, L., Renault, L., Sidobre, C., Michalakakis, Y., 2005a. Proteome of *Aedes aegypti* larvae in response to infection by the intracellular parasite *Vavraia culicis*. *Int. J. Parasitol.* 35, 1385–1397.
- Biron, D.G., Moura, H., Marche, L., Hughes, A.L., Thomas, F., 2005b. Towards a new conceptual approach to “parasitoproteomics”. *Trends Parasitol.* 21, 162–168.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Garrido-Bailón, E., Nanetti, A., Meana, A., Higes, M., 2012. *Nosema* spp. parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera* *abercensis*) colonies. *Environ. Microbiol. Rep.* 4, 57–65.

- Campbell, J., Kessler, B., Mayack, C., Naug, D., 2010. Behavioural fever in infected honeybees: parasitic manipulation or coincidental benefit? *Parasitology* 137, 1487–1491.
- Chan, Q.W.T., Melathopoulos, A.P., Pernal, S.F., Foster, L.J., 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics* 10, 387.
- Chauzat, M.-P., Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., Cougoule, N., Faucon, J.-P., 2007. Presence of *Nosema ceranae* in French honey bee colonies. *J. Apicult. Res.* 46, 127–128.
- Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(80–), 283–287.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtaye, A., Kretschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.-L., Alaux, C., 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* 8, e72016.
- Down, R.E., Bell, H.A., Bryning, G., Kirkbride-Smith, A.E., Edwards, J.P., Weaver, R.J., 2008. Infection by the microsporidium *Vairimorpha necatrix* (Microspora: Microsporida) elevates juvenile hormone titres in larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 97, 223–229.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.L., Plettner, E., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. *Nosema* spp. infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Chem. Ecol.* 36, 522–525.
- Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F., Le Conte, Y., Alaux, C., 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7, e37017.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretschmar, A., Le Conte, Y., 2013. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 42–51.
- EFSA, 2008. In: Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe – A Report from the Assessment Methodology Unit in Response to Agence Française EFSA Journal.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* 32, 356–365.
- Garcia, L., Saraiva Garcia, C.H., Calábria, L.K., Nunes, Costa, da Cruz, G., Sánchez Puentes, A., Bão, S.N., Fontes, W., Ricart, C.A.O., Salmen Espindola, F., Valle de Sousa, M., 2009. Proteomic analysis of honey bee brain upon ontogenetic and behavioral development. *J. Proteome Res.* 8, 1464–1473.
- Goblirsch, M.J., Spivak, M.S., Kurtz, T.J., 2013. A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. *PLoS One* 8, e69831.
- Goethals, K., Vereecke, D., Jaziri, M., Van Montagu, M., Holsters, M., 2001. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 27–52.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037–1053.
- Guttmann, D.S., 2004. Plants as models for the study of human pathogenesis. *Biotechnol. Adv.* 22, 363–382.
- Ha, E.-M., Oh, C.-T., Bae, Y.S., Lee, W.-J., 2005. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310, 847–850.
- Heintz, C., Ribotto, M., Ellis, M., Delaplane, K.S., 2011. Best management practices (BMPs) for beekeepers pollinating California's agricultural crops. *Bee Cult.*, 17–19.
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporida). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 211–217.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailon, E.G., Gonzalez-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jimenez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ. Microbiol.* 10, 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.
- Hoch, G., Schaffner, C., Henn, M.W., Schopf, A., 2002. Alterations in carbohydrate and fatty acid levels of *Lymantria dispar* larvae caused by a microsporidian infection and potential adverse effects on a co-occurring endoparasitoid, *Glyptapanteles liparidis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 50, 109–120.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A., Grozinger, C.M., 2013. Chronic parasitization by *Nosema* microsporida causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 14, 799.
- Huang, W.-F., Solter, L.F., 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 35–41.
- Huang, W.-F., Solter, L.F., Yau, P.M., Imai, B.S., 2013. *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathog.* 9, e1003185.
- Kahn, J.-E., Dutoit-Lefevre, V., Duban-Deweer, S., Chafey, P., Pottiez, G., Lefranc, D., Fain, O., Cordier, J.-F., Hatron, P.-Y., Bletry, O., Prin, L., 2011. Comparative proteomic analysis of blood eosinophils reveals redox signaling modifications in patients with FIP1L1-PDGFR α -associated chronic eosinophilic leukemia. *J. Proteome Res.* 10, 1468–1480.
- Kaneko, Y., Takaki, K., Iwami, M., Sakurai, S., 2006. Developmental profile of annexin IX and its possible role in programmed cell death of the *Bombyx mori* anterior silk gland. *Zool. Sci.* 23, 533–542.
- Karlhofer, J., Schaffner, C., Hoch, G., 2012. Reduced activity of juvenile hormone esterase in microsporida-infected *Lymantria dispar* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 126–128.
- Koella, J.C., Lynch, P.A., Thomas, M.B., Read, A.F., 2009. Towards evolution-proof malaria control with insecticides. *Evol. Appl.* 2, 469–480.
- Kubota, M., Tsuji, M., Nishimoto, M., Wongchawalit, J., Okuyama, M., Mori, H., Matsui, H., Surarit, R., Svasti, J., Kimura, A., Chiba, S., 2004. Localization of alpha-glucosidases I, II, and III in organs of European honeybees, *Apis mellifera* L., and the origin of alpha-glucosidase in honey. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 2346–2352.
- Liu, T.P., 1990. Ultrastructural analysis on the gland secretion in the extracellular ducts of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis*. *Tissue Cell* 22, 533–540.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailon, E., Higes, M., 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331–6338.
- Martin-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., Martínez-Salvador, A., Prieto, L., Meana, A., Higes, M., 2012. Microsporida infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environ. Microbiol.* 14, 2127–2138.
- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J. Invertebr. Pathol.* 100, 185–188.
- Molina-Cruz, A., DeJong, R.J., Charles, B., Gupta, L., Kumar, S., Jaramillo-Gutierrez, G., Barillas-Mury, C., 2008. Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *J. Biol. Chem.* 283, 3217–3223.
- Mostafavi, S., Ray, D., Warde-Farley, D., Grouios, C., Morris, Q., 2008. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol.* 9 (Suppl. 1), S4.
- Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y., 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur. J. Cell Biol.* 68, 450–456.
- Naug, D., Gibbs, A., 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40, 595–599.
- Parker, R., Melathopoulos, A.P., White, R., Pernal, S.F., Guarna, M.M., Foster, L.J., 2010. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. *PLoS One* 5, e11096.
- Peixoto, J.C., Calábria, L.K., Garcia, L., Capparelli, F.E., Goulart, L.R., de Sousa, M.V., Espindola, F.S., 2009. Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *J. Insect Physiol.* 55, 671–677.
- Pettis, J.S., Vanengelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G., 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153–158.
- Retschnig, G., Neumann, P., Williams, G.R., 2014. Thioclopid-*Nosema ceranae* interactions in honey bees: host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *J. Invertebr. Pathol.* 118C, 18–19.
- Rivero, A., 2006. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol.* 22, 219–225.
- Rivero, A., Agnew, P., Bedhomme, S., Sidobre, C., Michalakakis, Y., 2007. Resource depletion in *Aedes aegypti* mosquitoes infected by the microsporida *Vavraia culicis*. *Parasitology* 134, 1355–1362.
- Ryu, J.-H., Ha, E.-M., Oh, C.-T., Seol, J.-H., Brey, P.T., Jin, I., Lee, D.G., Kim, J., Lee, D., Lee, W.-J., 2006. An essential complementary role of NF-kappaB pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *EMBO J.* 25, 3693–3701.
- Schmitzová, J., Klaudivy, J., Albert, S., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Jádová, J., Simúth, J., 1998. A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol. Life Sci.* 54, 1020–1030.
- Seleznev, K.V., 2003. The role of microsporida in the disturbance of the hormonal balance in the infected insects. *Parazitologiya* 37, 428–435.
- Smoot, M.E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., Ideker, T., 2011. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 27, 431–432.
- Suwannapong, G., Yemor, T., Boonpakdee, C., Benbow, M.E., 2011. *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 236–241.
- Texier, C., Vidau, C., Vigues, B., El Alaoui, H., Delbac, F., 2010. Microsporida: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 443–449.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1, 377–396.
- Traver, B.E., Fell, R.D., 2011. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J. Invertebr. Pathol.* 107, 43–49.
- Tsuzuki, S., Iwami, M., Sakurai, S., 2001. Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 321–331.
- Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071–2077.
- vanEngelsdorp, D., Underwood, R., Caron, D., Hayes, J.J., 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the apary inspectors of America. *Am. Bee J.* 147, 599–603.
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R.M., Pettis, J., 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall, to spring 2008. *PLoS One* 3, e4071.

- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vignes, B., Brunet, J.L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P., Delbac, F., 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. PLoS One 6, e21550.
- Vincendeau, P., Gobert, A.P., Daulouède, S., Moynet, D., Mossalayi, M.D., 2003. Arginases in parasitic diseases. Trends Parasitol. 19, 9–12.
- Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2012. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. J. Invertebr. Pathol. 109, 326–329.
- Zander, E., 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. Münchener Bienenzeitung 31, 196–204.

**CHAPITRE VI: IMPACT DE L'INFECTION PAR *NOSEMA*
CERANAE SUR LE RENOUVELLEMENT CELLULAIRE
DE L'EPITHELIUM INTESTINAL DE L'ABEILLE**

Suite à ces deux premières études où nous avons montré un impact potentiel de l'infection par les microsporidies sur le cycle cellulaire (**Chapitre IV**) et sur le développement du tissu intestinal (**Chapitre VI**), nous avons choisi ensuite de nous focaliser sur l'impact de l'infection par *N. ceranae* sur le renouvellement de l'épithélium intestinal de l'abeille. En effet, la défense face à un pathogène ne se limite pas à la résistance (réponse immunitaire), il peut aussi y avoir un phénomène de résilience. Ce phénomène peut s'observer quand le coût nécessaire à la réponse immunitaire est supérieur au coût de réparation des dommages occasionnés par le parasite (Ferrandon, 2013). Ainsi, les mécanismes de renouvellement de l'épithélium intestinal en cas d'agression par un pathogène jouent un rôle central dans la survie de l'hôte. Il a d'ailleurs été montré que des drosophiles déficitaires pour certaines voies de contrôle du renouvellement présentaient des surmortalités importantes en cas d'infections intestinales (Buchon et al., 2010). Cette hypothèse d'un impact potentiel de l'infection par *N. ceranae* sur l'épithélium intestinal a également été suggérée par de précédentes études. Dussaubat et al., (2012) ont ainsi montré un impact significatif de l'infection sur l'expression du gène Wingless (*wg*) qui est central dans le contrôle des voies de régulation du renouvellement intestinal. Aufauvre et al., (2014) ont également montré suite à l'infection une perturbation du facteur de transcription Hox qui est impliqué dans le développement tissulaire.

Ainsi, afin d'évaluer par une méthode directe l'impact du parasite sur le renouvellement intestinal, j'ai mis au point un protocole me permettant de suivre l'activité mitotique des cellules souches de l'intestin à l'aide d'un marquage au BrdU (bromodésoxyuridine). Le BrdU est un analogue de la thymidine qui va s'intégrer dans l'ADN de la cellule lorsque celle-ci se réplique. Un anticorps permet ensuite de localiser les noyaux l'ayant incorporé. Dans notre cas, les abeilles sont nourries à l'aide d'une solution de BrdU (5mg/ml) dilué dans du sucrose 50% 12h avant l'échantillonnage. A chaque point d'échantillonnage, les intestins sont fixés, inclus en paraffine puis coupés. Les coupes ainsi obtenues permettent grâce au marquage avec l'anticorps anti-BrdU, de dénombrer les cellules souches ayant eu une activité de réplication au cours des 12h précédant l'échantillonnage.

Nous avons donc réalisé une infection expérimentale au cours de laquelle le renouvellement de l'épithélium intestinal a été suivi au cours d'une cinétique d'infection de 22 jours. Afin d'identifier les voies de signalisation impliquées dans cette réponse, nous avons

également suivi en PCR quantitative l'expression de 11 gènes appartenant aux principales voies de régulation du renouvellement de l'épithélium intestinal (*stat*, *ras*, *foxo*, *keren*, *hippo*, *armadillo*, *wingless*, *nrf2*). Le résultat de cette étude fera l'objet d'une publication dont la rédaction est en cours et dont une version préliminaire vous est présentée à la suite.

The microsporidian *Nosema ceranae* can impact the gut epithelium renewal of the honey bee, *Apis mellifera*

Johan PANEK^{1,2,3}, Diane Roriz^{1,2,3}, Anne MONE^{1,2,3}, Frédéric DELBAC^{1,2,3}, David G. BIRON^{1,2,3}, Hicham EL ALAOUI^{1,2,3,*}

¹ Microorganismes : Génomes et Environnement (LMGE), CNRS : UMR6023, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, Campus des Cézeaux, 24, avenue des Landais BP 80026 63 170 AUBIERE -France.

² Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II (UBP), Clermont Université, 34, avenue Carnot - BP 185 - 63006 Clermont-Ferrand cedex - France.

³ Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand 1 (UDA), Clermont Université, 49, Boulevard François-Mitterrand
- CS 60032 - 63001 Clermont-Ferrand cedex 1 - France.

* Corresponding author. Mailing address: CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63177 Aubière, France.
Phone: 33-4-73-40-74-31. Fax: 33-4-73-40-76-70. E-mail: hicham.el_alaoui@univ-bpclermont.fr.

I. Introduction

The western honeybee *Apis mellifera* is a beneficial insect of agronomic and environmental importance (Gallai et al., 2009). For the last decades, bee colony losses have been reported worldwide at alarming rates. The causes are likely multifactorial involving predators, pesticides and pathogens (vanEngelsdorp and Meixner, 2010). Among them, the microsporidian gut parasite *Nosema ceranae* is one of the most common parasite of *Apis mellifera* (Mariano Higes et al., 2008). *N. ceranae* belongs to microsporidia, a group of obligate intracellular eukaryotic parasites, that comprises 187 genera and over 1300 species (Vávra and Lukeš, 2013). Microsporidia are responsible for many infectious diseases both in vertebrates and invertebrates (Texier et al., 2010). Indeed, they are of major economic implication in animal farming (beekeeping, sericulture and aquaculture) and in human they are considered as emerging pathogens (Texier et al., 2010).

Nosemosis is a widespread disease which could be a serious threat for honeybee health. Two microsporidian species could be responsible for this disease: *Nosema apis*, described in 1909 (Zander, 1909) and *Nosema ceranae* described in 1996 and originated from the asian honeybee species *Apis cerana* (Fries et al., 1996). During the last decades, *N. ceranae* seemed to have jumped from *A. cerana* to *A. mellifera*, and may have spread around the world. It is now present in all continents, alone or in association with *N. apis* (Klee et al., 2007). Despite several studies, the virulence of *N. ceranae* is still controversial, as this parasite has been found in poorly impacted (Martín-Hernández et al., 2011; Vidau et al., 2011; Dussaubat et al., 2013; Milbrath et al., 2015) and weakened honeybee colonies (Higes et al., 2007). The major disturbances described in infected honeybees are energetic stress (Mayack and Naug, 2009; Alaux et al., 2010), behavioral fever (Campbell et al., 2010; Dussaubat et al., 2013), hormonal disturbance

(Dussaubat et al., 2010; Holt et al., 2013), immunity depletion (Antunez et al., 2009; Alaux et al., 2010) and a decrease in the insect lifespan (M Higes et al., 2008; Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011; Aufauvre et al., 2012, 2014; Goblirsch et al., 2013). *N. ceranae* can also sensitize the honeybees to chemical stressors (Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011; Aufauvre et al., 2012, 2014; Pettis et al., 2012; Wu et al., 2012; Retschnig et al., 2014) and can reduce the efficiency of acaricide treatment against *Varroa destructor* (Botías et al., 2012), a major threat for honeybees.

The honeybee midgut is involved in immunity, digestion and detoxication, it is also the primary site of *N. ceranae* proliferation and can, thus, be impaired by this parasite. The insect host defence against pathogens is not restricted to resistance, which corresponds to intestinal immune system. The resilience can also occur when fighting the pathogen can cost more than damage repairs (Ferrandon, 2013). It is the case in the gut when the epithelium renewal could compensate the damages imposed by the parasite. This gut homeostasis is slightly regulated by different pathways involved in gut integrity and by the microbiome pressure (Buchon et al., 2009). Aging, oxidative stress and infections led to enterocyte damages and cell deaths that are compensated by the proliferation of the intestinal stem cells (ISCs) (Jiang and Edgar, 2009; Biteau et al., 2012; Ferrandon, 2013). These damages can be sensed by the Hippo and JNK pathways and signals are transmitted to ISCs directly or by the unpaired cytokines (Upd1, 2 and 3) for gut renewal as demonstrated in *Drosophila melanogaster* (Buchon et al., 2009; Staley and Irvine, 2010; Osman et al., 2012).

Recently, different studies have evoked that the honeybee gut renewal signalling pathways can be impaired by *N. ceranae* infection (Vidau et al., 2014; Dussaubat et al., 2012). We, thus, hypothesize that the honey bee lifespan reduction caused by *N. ceranae* infection could be due to an alteration of gut epithelium homeostasis through a perturbation of its renewal ability.

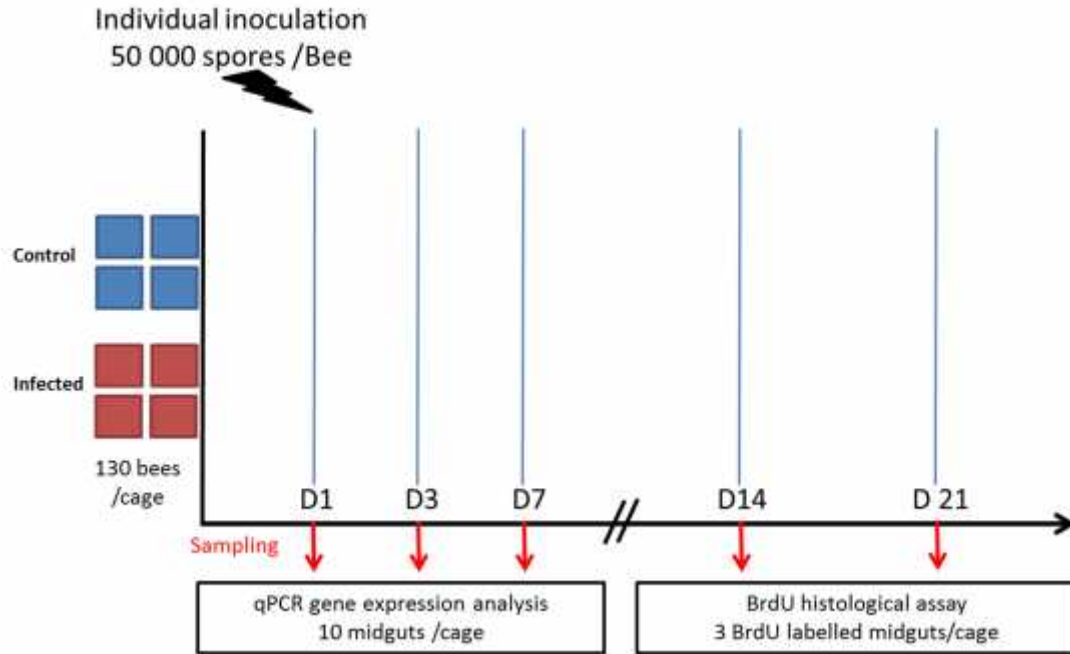


Figure 19: Experimental design.

We have two groups, infected (red) and control (blue). At day 1, bees were individually fed with sucrose solution (control) or spore solution (infected). Each treatment was made in 4 replicates of 130 bees. The mortality and the sucrose consumption were monitored each day. At each sampling points (vertical lines), i.e. 1, 3, 7 14 and 21 days post infection, 10 midguts per replicate were sampled for the gene expression analysis and 3 midguts per replicate were sampled for the BrdU assay.

In this way, we evaluated the impact of *N. ceranae* on the honey bee epithelium renewal, and we explored some the pathways involved in gut homeostasis. For this purpose, we followed the mitotic index of midgut stem cells during a 22 days kinetics of *N. ceranae* infection. At the same time, we followed the expression of 11 genes coding for key proteins involved in the main pathways implicated in the gut epithelium renewal and homeostasis. This study has provided new data concerning the honeybee response to the gut parasite *N. ceranae* at both tissue and molecular levels.

II. Material and methods

1. Bees, Parasites and Insecticides

Experiments were performed in 2014 using honeybees from an *A. mellifera* colony. Two frames of sealed brood were collected from a colony localized in an apiary near Combronde France (N 46°0'0.217'' E 3°4'4.968''). The collected frames were placed in an incubator in the dark at 33°C with 80% r.h. Emerging honeybees were then collected and distributed into cages (130 bees/cages) according the experimental design shown in figure 19. Honeybees were then individually infected by feeding with 3 µl of sweetened water (50% honey/50% water) containing 50,000 spores of *N. ceranae* that were freshly purified according to Vidau et al. (2011). Control honeybees were individually fed with 2 µl of sweetened water without any *N. ceranae* spores. Four cages of each group (e.g., *N. ceranae*-infected and uninfected honeybees) were formed and maintained in separated incubators in the dark at 33°C with 80% r.h. A 5 mm piece of Beeboost® (Phero Tech, Inc., Canada) that released 5 queen mandibular pheromones were placed in each cage to simulate the hive environment. During all the experiment, honeybees were fed *ad libitum* with 50% (w/v) sugar syrup supplemented with 1% (w/v) Provita'Bee (Vetopharm Pro). Every

day, feeders were replaced and dead bees were counted and removed, and the sucrose consumption was quantified. The spore concentration in the rectum was determined by counting using a haemocytometer chamber. *N. ceranae* species was confirmed by PCR according to Martin-Hernandez *et al.* (2007) (Martin-Hernandez *et al.*, 2007).

2. RNA extraction

For each sampling point, 10 honeybee midguts per cage were dissected on ice, pooled and immediately immersed in liquid nitrogen, leading to 4 pools of RNA samples per condition. Collected midguts were homogenized in 500 µL TRIzol Reagent (Life Technologies) using a microtube pestel. Then, according to the manufacturer, a phase separation was performed, the aqueous phase was supplemented with 0.015 volume of β -mercaptoethanol, one volume of 70% ethanol and transferred to an RNeasy spin column (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Total RNA was isolated according to the manufacturer. Genomic DNA was removed using the RNA-free DNase kit (Qiagen), the treatment has been repeated twice during each RNA extraction. RNA integrity and quantity were evaluated using the 2200 TapeStation (Agilent) with D1000 screen tape. Only RNA with a RIN score > 8 were used for further experiments. For each condition (uninfected and infected bees), only the 3 replicates (among the 4) with the best RIN scores were kept and used for further experiments.

3. Quantitative Real-time PCR

According to Aufauvre *et al.* (Aufauvre *et al.*, 2014), cDNA synthesis was performed in a 20 µL reaction containing 1 µg of total RNA, 0.5 µg of oligo(dT) 12–18 primers (Life Technologies), 0.5 mM of each dNTP and 200 U of SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies). For each sample, a control with no reverse-transcriptase (No-RT) control was done to control the absence of DNA contaminants. All real-time quantitative PCR analyses were performed in 96-

well plates on a Mastercycler ep Realplex 2 thermocycler (Eppendorf) monitored by the Realplex software (version 1.5) using the primers and conditions listed in Table S1. All primers, whether they were already published or newly designed, have been validated according to their specificity, linearity, efficiency and amplification reproducibility (Table S1). qPCR reaction mixtures consisted in 5 μ L cDNA at 15 ng. μ L⁻¹, the appropriate concentration of each primer and 10 μ L of 2X Absolute Blue QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific) in a final volume of 20 μ L. Negative controls (without cDNA and No-RT) were included in each reaction. The PCR program consisted in an initial step at 95°C for 15 min, and 40 cycles of 95°C for 15 s, specific annealing temperatures for 30s and 72°C for 30 s. Fluorescence was measured in each cycle after the elongation step. The specificity of the reaction was checked by analyzing the melting curve of the final amplified products. The amplification results were expressed as the threshold cycle number (CT), which represents the number of cycles needed to generate a fluorescent signal greater than a predefined threshold. CT values were normalized by subtracting the CT value of the ribosomal protein S5 (RpS5), an housekeeping gene (Evans and Wheeler, 2000; Evans, 2004; Aufauvre et al., 2014) from the corresponding cDNA sample. For every gene, data were analyzed using the QIAGEN Relative Expression Software Tool 2009 (REST 2009) (Pfaffl et al., 2002), a value P(H1) = 0.05 being accepted as significant.

4. ISC Proliferation Assay

Following Wards *et Al.* 2008 (Ward et al., 2008) with few modifications, the assessment of proliferation rate of intestinal stem cells relied on immune histochemical labelling of the thymidine analog 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporated into newly synthesized DNA. One day before each sampling point, 3 bees per cage were randomly selected. These bees were individually fed with 5 μ L of 5 mg/ml BrdU (Sigma) in 50% (w/v) sucrose solution, and placed in

new cages in the dark at 33°C with 80% r.h for 12h in order to allow the BrdU incorporation. After this incubation, healthy individuals were selected for further analysis.

Dissected midguts were rinsed with PBS, fixed in Carnoy's fixative for 1 h at room temperature, then dehydrated and embedded in paraffin for sectioning (6µm). Section were dewaxed in histoclear, rehydrated via a graded alcohol series and permeabilized in PBS with 0.01% Triton X100 (PBS-T) for 5 min. Endogenous peroxidases were inhibited with 0.3% H₂O₂ for 30 min and DNA was denatured with 2N Hypochloric acid in PBS-T for 1 h. After 3 washes in PBS-T, sections were blocked with 3% BSA in PBS-T supplemented with avidin (Avidin/Biotin Blocking kit, Vector Laboratories) for 1h and incubated overnight with 1/250 Anti-BrdU monoclonal primary antibodies (Sigma-Aldrich) in PBS-T supplemented with biotin (avidin/biotin blocking kit, Vector Laboratories) at 4°C. After 3 washes in PBS-T, sections were incubated with 1/500 biotinylated goat anti-mouse secondary antibody (Cell signaling) in PBS-T for 1h and washed 2 times in PBS-T. Amplification was done by incubation with 1/500 HRP-conjugated streptavidin (Cell signaling) for 30 min and, after 2 washes in PBS-T, signals were revealed with Novared kit accordingly to manufacturer instructions (Vector Laboratories). After dehydration, sections were cleared in histoclear and mounted with Cytoseal 60 (VWR). Observations were done on Zeiss Axiovert 200 M inverted epifluorescence microscope.

For each individual, 1 randomly selected section was observed and all labelled nuclei and active centers of proliferation (crypts) were counted. An active crypt was defined as containing at least one labelled nucleus. The effects of the infection and the honeybee ages on the gut renewal were assessed by a two-way ANOVA after an Arcsin normalization of the counted data.

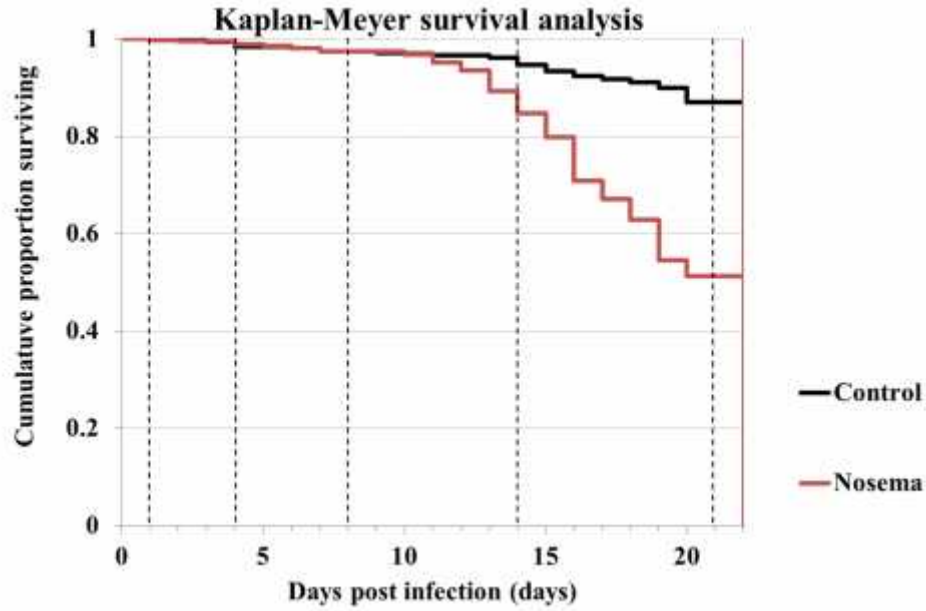


Figure 20: Effect of the infection by *Nosema ceranae* on the honeybee survival rate.

Data give the cumulative proportion of surviving honeybees exposed to no treatment (black), and to *N. ceranae* infection (red) from day 0 to day 21. Data from 520 honeybees per experimental condition were analyzed using the Kaplan-Meier method. Sampling points were represented by vertical dash lines.

III. Results and Discussion

To analyze the honeybee response to *N. ceranae* infection, the experiment was designed from two sets of independent biological quadruplicates (uninfected vs infected bees). The honey bees were heavily infected as 7.66×10^7 spores were counted in each rectum 7 days post infection (dpi) (Figure S1). A significant mortality appeared 14 dpi (10%) and reached almost to 50% at the end of the experiment (22 dpi), whereas 13% of mortality were observed for the uninfected honeybees (Figure 20). No difference in sucrose consumption between control and infected bees were observed (Figure S2). Our study is in accordance with previous ones that have reported that honeybees infected with *Nosema* spp. have a shorter lifespan in the field and in experimental conditions (M Higes et al., 2008; Alaux et al., 2010; Vidau et al., 2011, 2014; Aufauvre et al., 2012; Dussaubat et al., 2012). These data suggested also that the reduced longevity observed in caged bees could be strongly linked to severe cellular damages induced at the intestinal level by starvation imposed by *Nosema* development (Mayack and Naug, 2009). It is conceivable that the degeneration of epithelial ventricular cells and subsequent longevity reduction could also be linked to oxidative stress triggered by *N. ceranae* infection (Dussaubat et al., 2012; Vidau et al., 2014).

To assess such an hypothesis, 12 honeybee midguts were labeled with BrdU at each sampling point time of the infection kinetics. For each gut, labeled nucleus and active crypts were counted on 1 randomly-selected section, and the ratio “active crypts over the total crypts” was calculated. After normalization with an ArcSinus transformation of the data, the statistical significance of the effects of the infection and the honeybee ages on the epithelium renewal rate was evaluated by a two-way ANOVA. The statistical analysis revealed us a significant effect of the age of honey bee (p-value = 0.006) but also of the infection (p-value = 0.0018) but no interaction effect between

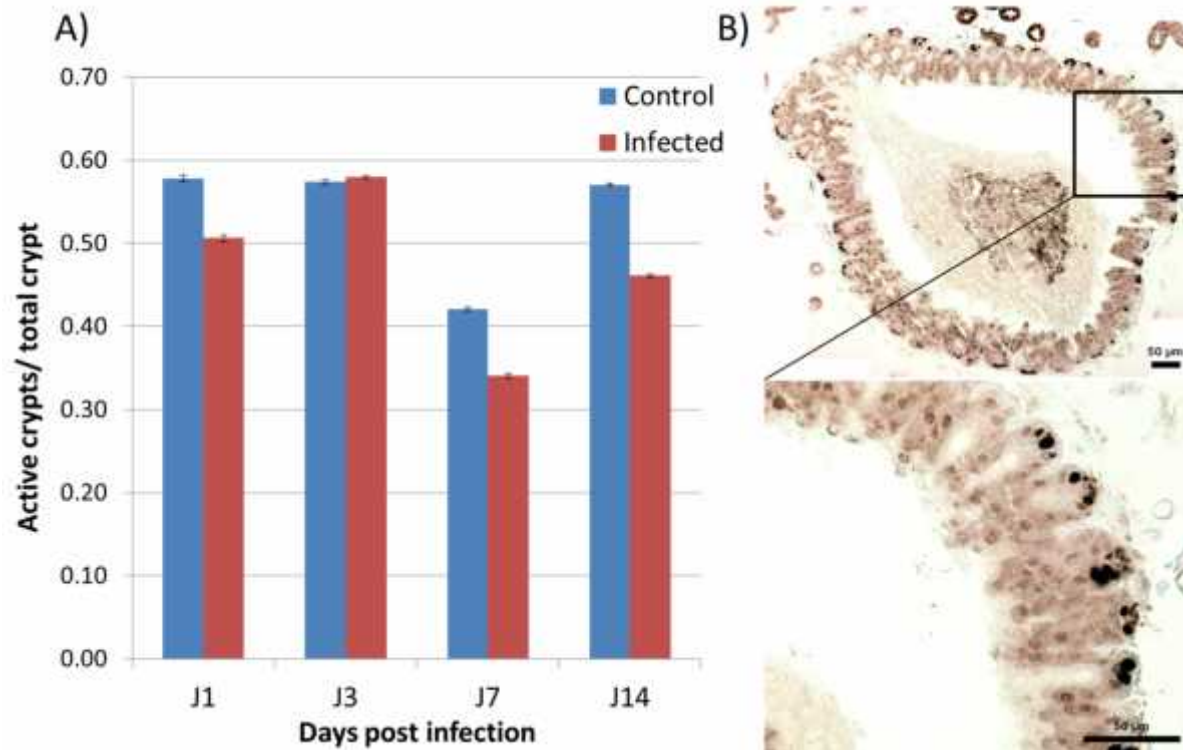


Figure 21: ISC proliferation assay

A) Histogram of the active / total crypts ratios for control and infected honey bees at different times post infection. The ANOVA2 statistical analysis revealed a significant effect of the age of honey bees (p-value = 0.006) and of the infection status (p-value = 0.0018) but no interaction effect. B) Microscopic images of BrdU-labelled intestinal stem cells. The honey bee midgut is organized in crypts where intestinal stem cells localized at the basal side. For the analysis, we calculated the ratio of crypts with at least one labelled nucleus over the total crypt number.

both parameters (Figure 21). This indicates the infection has an effect on the gut renewal over all the experiment and shows a significant down-regulation of ISC proliferation in the honeybee gut. This decrease was observed for all points of the kinetics except for the 3 dpi point, probably due to the absence of spores in the gut lumen. Indeed, after the infection with *N. ceranae* spores, non-adherent and non-infective spores were rapidly washed out. Thereafter, the parasites disappeared from the lumen, as they have grown inside the host cells. No massive spore loads were found before at least 6-7 dpi (Higes et al., 2007). This point can induce some questions about the amount of parasites needed to induce such an effect on host tissue and if it is the host response (such as the oxidative stress) that could be responsible of this effect. This effect was already been observed in the case of infection of E6 VERO cells (ATCC) by *Encephalitozoon* species (Scanlon et al., 2004), where the host cell cycle was arrested by the infection. But the underlying mechanisms can be different in both cases and have not been described.

This impact was supported by the work of Dussaubat et al. 2012 (Dussaubat et al., 2012), where 4 genes of the Wnt signaling pathway were found to be down-regulated 10 dpi (*frizzled2*, *groucho*, *basket* and *armadillo*). This pathway is well known to promote and control the epithelium self-renewal in the *Drosophila* midgut (Lin et al., 2008). Control of the gut epithelium renewal is complex and controlled by several signaling pathways that could be divided in two distinctive parts (Figure 22): (i) the EGFR/InR and Wnt pathways which are essential to sustain the basal self-renewal of ISCs under normal conditions and (ii) the Hippo/yorkie, Jak/STAT and JNK pathways which are important in ISCs proliferation in response to tissue injuries and oxidative stress (Biteau et al., 2011). Hence, we assumed that the parasite could modulate the gut epithelium renewal on a direct (host manipulation by pathogen effectors) or an indirect manner (perturbation of proliferation due to tissue damage response). In our experiment, statistical

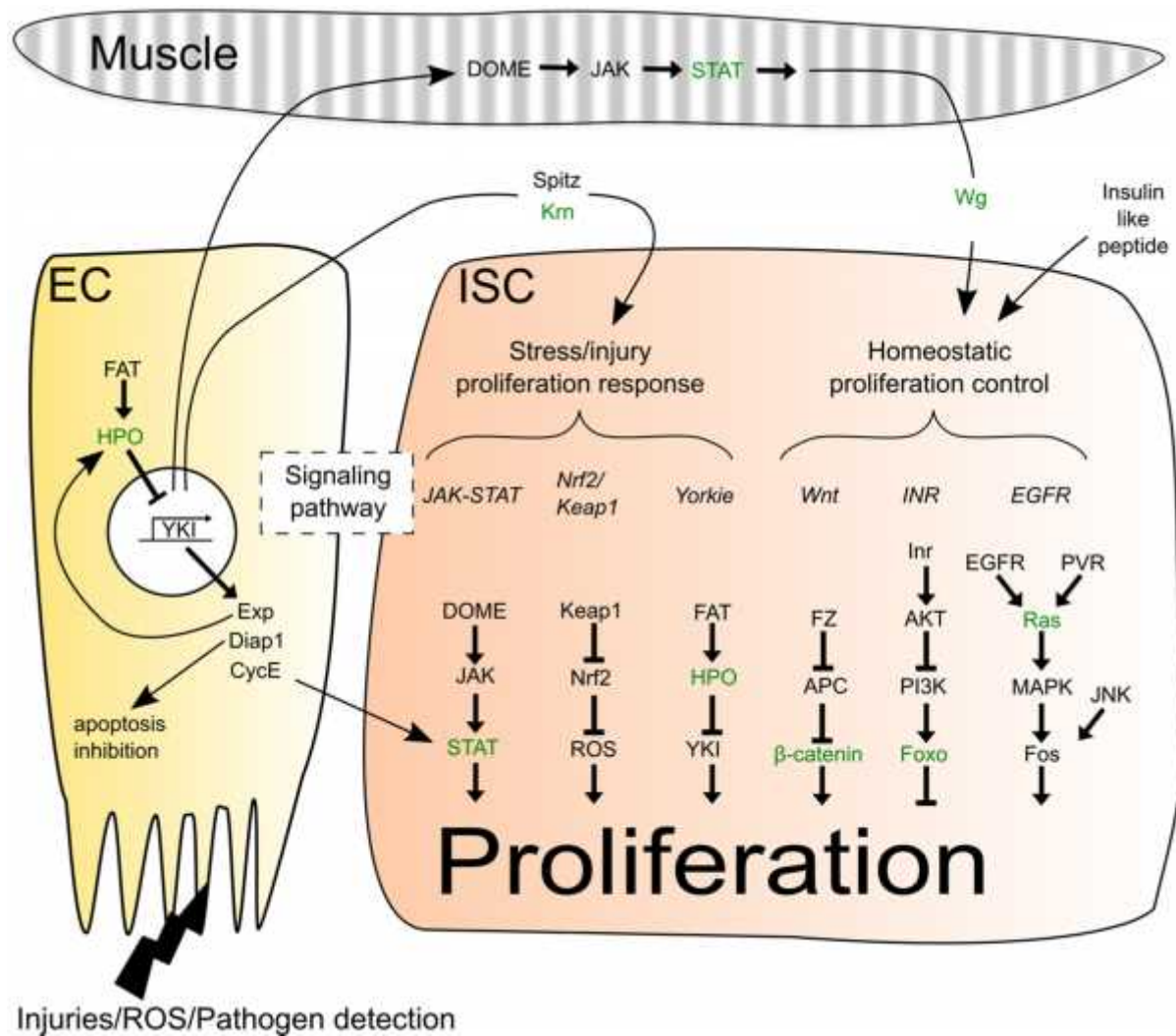


Figure 22: Signaling pathways involved in the control of the intestinal stem cell proliferation.

ISCs proliferation rate is the result of the integration of numerous signaling pathway that allow the cell to adapt their proliferation to tissue demand. Wnt, Inr and EGFR Signaling pathways are required for homeostatic proliferation, and Yorkie, JAK-STAT, Nrf2 pathways are required for stress- and injury-induced ISC proliferation response. the genes in green were monitored with RT-qPCR.

analyses with REST 2009 software reveal us that 6 of the all genes were significantly upregulated by infection 7dpi (Figure 23), 4 were upregulated 14dpi (Keren, Foxo, Ras and Armadillo) and only Stat was upregulated 21dpi. The upregulation of the *Keren* gene revealed us that Hippo/yorkie, JNK and/or Jak/STAT pathways are significantly activated 7 dpi. This activation indicates that the infection or the damages induced by the infection are well detected by the gut. The effect of an overexpression of *Keren* in *D. melanogaster* is a stimulation of the proliferation rate as the cytokine Keren could bind and activate the epidermal growing factor receptor (EGFR) (Ferrandon, 2013). This is in contradiction with our BrdU labeling results which have shown a decrease of gut renewal. This suggests differences in gut renewal regulation between *D. melanogaster* and *A. mellifera* or that the disruption could occur elsewhere in the signaling pathways. Hippo and Foxo pathways (Figure 22) are known to inhibit proliferation of ISCs, the genes coding these regulators are up-regulated in our study suggesting that the gut renewal decrease is mainly due to these pathways. But this questioned about the influence of the different pathways on honeybee gut homeostasis. Moreover, it is difficult to conclude on the basis of only gene expression and regulation of several proteins involved in these pathways occurred through phosphorylation. Then, additional experiments using phosphoproteomic and functional approaches will be useful to better understand the role of the different signaling pathways in honeybee gut homeostasis.

In this work, we have shown for the first time that *N. ceranae* negatively can alter the gut epithelium renewal rate and perturb the signaling pathways involved in the gut homeostasis. Considering the oxidative burst and the higher energetic demand induced by the infection (Vidau et al., 2014), this alteration of gut renewal could be an another cause of the observed lifespan

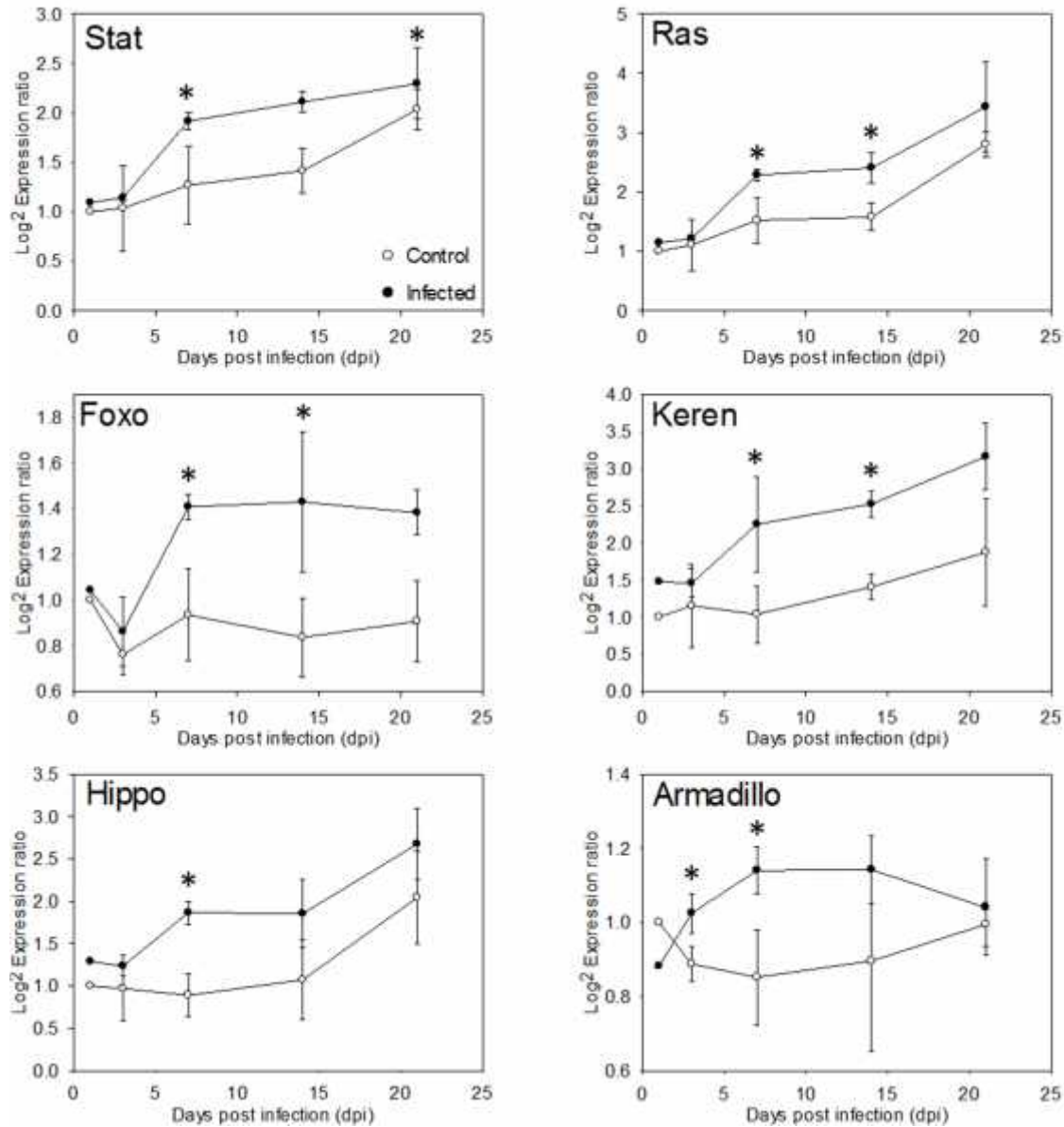


Figure 23: Gene expression profile

Expression level of 6 genes implicated in the regulation of the epithelium renewal at 1, 3, 7, 14 and 21 days post infection. The asterisk indicates a significant difference of gene expression level between the two conditions (infected vs uninfected). The expression level of wingless revealed no significant differences and is not represented here.

reduction of infected honeybees. But, underlying are unknown and more works are needed to understand mechanisms which are responsible of those perturbations.

IV. Acknowledgements

We would like to thank Christelle Soubeyrand-Damon for her precious advises concerning the immuno-histological approaches. This work is supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) (grant no. ANR-12-BSV3-0020). D.R. acknowledges the support of a Fellowship from the French National Research Agency (grant no. ANR-12-BSV3-0020). J.P. was supported by a grant from the ‘‘Ministère de l’Education Nationale de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche’’.

V. Bibliography

- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., et al. (2010) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Env. Microbiol* **12**: 774–782.
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., and Higes, M. (2009) Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Env. Microbiol* **11**: 2284–2290.
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., et al. (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci Rep* **2**: 326–333.
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., and Blot, N. (2014) Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PLoS One* **9**: e91686.

- Biteau, B., Hochmuth, C.E., and Jasper, H. (2011) Maintaining tissue homeostasis: Dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* **9**: 402–411.
- Biteau, B., Hochmuth E., C., and Jasper, H. (2012) JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* **29**: 997–1003.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Garrido-Bailón, E., Nanetti, A., Meana, A., and Higes, M. (2012) *Nosema spp.* parasitization decreases the effectiveness of acaricide strips (Apivar®) in treating varroosis of honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. *Environ. Microbiol. Rep.* **4**: 57–65.
- Buchon, N., Broderick, N. a, Chakrabarti, S., Lee, W., and Lemaitre, B. (2009) Invasive and indigenous microbiota impact intestinal stem cell activity through multiple pathways in *Drosophila*. *Genes Dev.* 2333–2344.
- Campbell, J., Kessler, B., Mayack, C., and Naug, D. (2010) Behavioural fever in infected honeybees: parasitic manipulation or coincidental benefit? *Parasitology* **137**: 1487–91.
- Dussaubat, C., Brunet, J.L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.H., et al. (2012) Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS One* **7**: e37017.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.L., Plettner, E., et al. (2010) *Nosema spp.* infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *J Chem Ecol* **36**: 522–525.
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., et al. (2013) Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. *J. Invertebr. Pathol.* **113**: 42–51.
- Evans, J.D. (2004) Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* **85**: 105–11.
- Evans, J.D. and Wheeler, D.E. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination. *Genome Biol.* 1–6.
- Ferrandon, D. (2013) The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. *Curr. Opin. Immunol.* **25**: 59–70.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S.B., and Pieniazek, N.J. (1996) *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *EUR J PROTISTOL* **32**: 356–365.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., and Vaissière, B.E. (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* **68**: 810–821.
- Goblirsch, M.J., Spivak, M.S., and Kurtti, T.J. (2013) A cell line resource derived from honey bee (*Apis mellifera*) embryonic tissues. *PLoS One* **8**: e69831.

- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., and Meana, A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J Invertebr Pathol* **94**: 211–217.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E.G., Gonzalez-Porto, A. V, Barrios, L., et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Env. Microbiol* **10**: 2659–2669.
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E.G., Gonzalez-Porto, A. V, Barrios, L., et al. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Env. Microbiol* **10**: 2659–2669.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A., and Grozinger, C.M. (2013) Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **14**: 799.
- Jiang, H. and Edgar, B. a (2009) EGFR signaling regulates the proliferation of *Drosophila* adult midgut progenitors. *Development* **136**: 483–93.
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., et al. (2007) Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* **96**: 1–10.
- Lin, G., Xu, N., and Xi, R. (2008) Paracrine Wingless signalling controls self-renewal of *Drosophila* intestinal stem cells. *Nature* **455**: 1119–23.
- Martín-Hernández, R., Botías, C., Barrios, L., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Mayack, C., and Higes, M. (2011) Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* **109**: 605–612.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailon, E., and Higes, M. (2007) Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Env. Microbiol* **73**: 6331–6338.
- Mayack, C. and Naug, D. (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* **100**: 185–188.
- Milbrath, M.O., Tran, T. Van, Huang, W., Solter, L.F., Tarpy, D.R., Lawrence, F., and Huang, Z.Y. (2015) Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* **125**: 9–15.
- Osman, D., Buchon, N., Chakrabarti, S., Huang, Y.-T., Su, W.-C., Poidevin, M., et al. (2012) Autocrine and paracrine unpaired signalling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *J. Cell Sci.* 5944–5949.
- Pettis, J.S., Vanengelsdorp, D., Johnson, J., and Dively, G. (2012) Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* **99**: 153–158.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST ©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**.

- Retschnig, G., Neumann, P., and Williams, G.R. (2014) Thiacloprid-*Nosema ceranae* interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *J. Invertebr. Pathol.* **118C**: 18–19.
- Scanlon, M., Leitch, G.J., Visvesvara, G.S., and Shaw, A.P. (2004) Relationship between the host cell mitochondria and the parasitophorous vacuole in cells infected with *Encephalitozoon* microsporidia. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**: 81–7.
- Staley, B.K. and Irvine, K.D. (2010) Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Curr. Biol.* **20**: 1580–7.
- Texier, C., Vidau, C., Vignes, B., El Alaoui, H., and Delbac, F. (2010) Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr Opin Microbiol* **13**: 443–449.
- vanEngelsdorp, D. and Meixner, M.D. (2010) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* **103**: S80–95.
- Vávra, J. and Lukeš, J. (2013) Microsporidia and the art of living together. In, Rollinson, D. (ed), *Advances in parasitology*. Academic Press, pp. 253–319.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vignes, B., Brunet, J.L., et al. (2011) Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* **6**: e21550.
- Vidau, C., Panek, J., Texier, C., Biron, D.G., Belzunces, L.P., Le Gall, M., et al. (2014) Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *J. Invertebr. Pathol.* **121**: 89–96.
- Ward, K.N., Coleman, J.L., Clinnin, K., Fahrbach, S., and Rueppell, O. (2008) Age, caste, and behavior determine the replicative activity of intestinal stem cells in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Exp. Gerontol.* **43**: 530–7.
- Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M., and Sheppard, W.S. (2012) Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *J Invertebr Pathol.*
- Zander, E. (1909) Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* **31**: 196–204.

Table S1. Primer characteristics

[illegible]

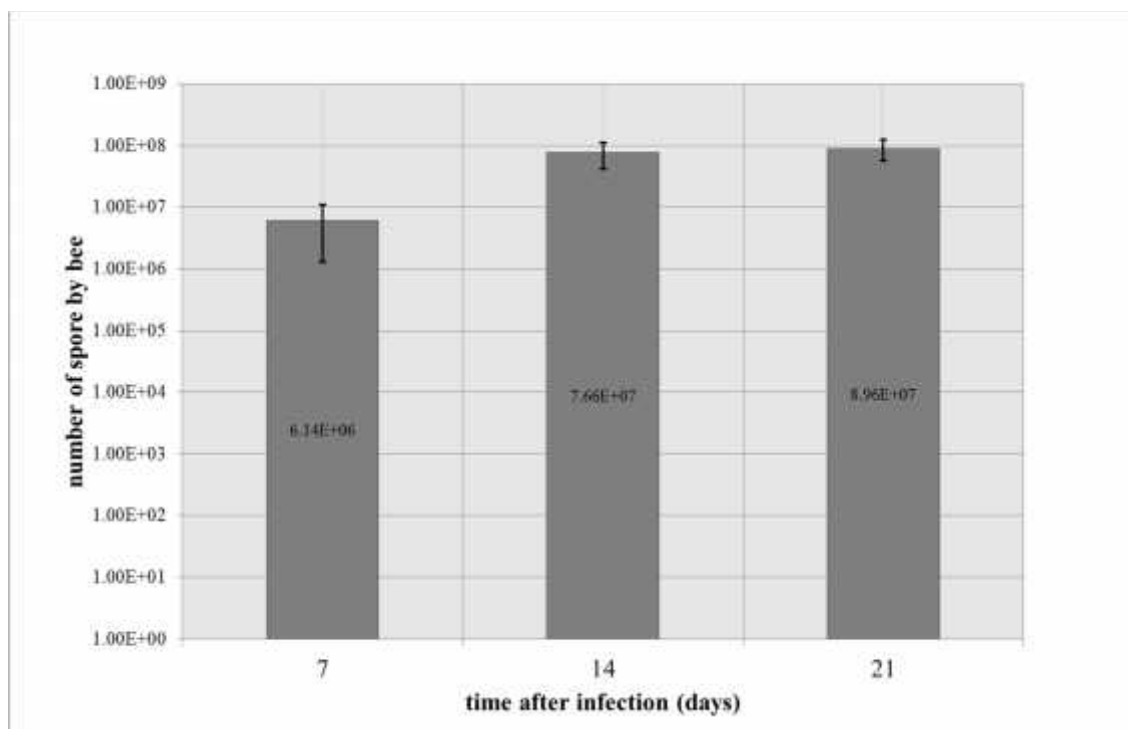


Figure S1. Spore production

The spore production in the digestive tract was assessed for each sampling point by counting the spore number in the remaining rectums of bees that were sampled for the RT-qPCR assay. Data represent the mean numbers of spores/honeybee (~ 25 rectums per sampling point). No spore can be found before day 7 post infection.

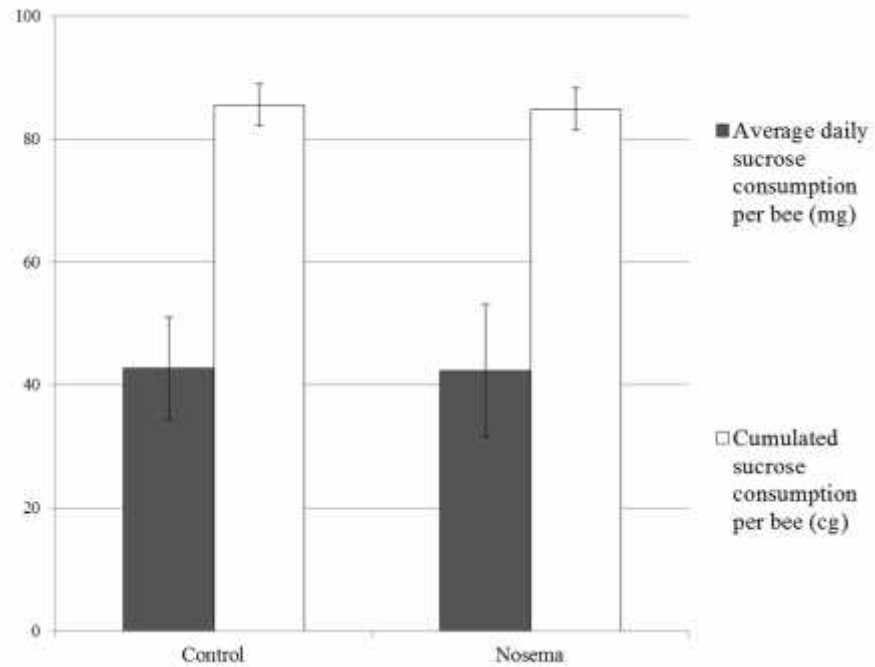


Figure S2. Sucrose consumption

Grey histograms represent the mean sucrose consumption per bee (mg), White histograms represent the cumulated sucrose consumption per bee during the experiment. No significant differences were found between uninfected and infected honey bees.

CHAPITRE VII: CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les relations hôte-parasite sont le fruit de millions d'années de coévolution durant lesquelles parasites et hôtes se sont adaptés afin de développer des stratégies leur permettant de survivre ensemble. Avec l'essor des outils « omiques » ces dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur ces interactions et ont permis d'avoir un aperçu sur les stratégies mises en œuvre par ces deux acteurs. Dans cette optique, l'objectif de cette thèse était d'enrichir en nouvelles données sur ces interactions en utilisant majoritairement la protéomique qui nous a paru être le niveau d'étude bien adapté. Les protéines sont en effet les molécules possédant *in fine* la fonction biologique et contribuant, en partie, aux interactions hôte-parasite. De tous les parasites eucaryotes intracellulaires obligatoires, les microsporidies sont certainement parmi ceux ayant dû acquérir les stratégies les plus sophistiquées afin de pirater leurs hôtes, ce qui en fait des modèles d'intérêt. Dans ce cadre-là, ma thèse a permis d'apporter des résultats originaux posant les bases d'un décryptage du dialogue mis en place lors de l'interaction hôte-microsporidie aux deux niveaux d'intégration cellulaire et tissulaire.

1. Niveau cellulaire – interaction *A. algerae*-Cellules HFF (Chapitre IV)

Cette étude nous a permis de suivre la réponse protéique de cellules HFF à l'infection par la microsporidie *A. algerae* au cours d'une cinétique d'infection de 8 jours. La puissance de la technique utilisée (le SILAC) ainsi que le plan expérimental (3 réplicats biologiques) nous a permis d'identifier des protéines spécifiquement modulées par l'infection et dont les ratios d'expression ne variaient que très faiblement suite à l'infection. Pour la première fois, notre étude a également permis d'identifier en parallèle un ensemble de protéines parasitaires qui, bien que n'ayant pu être observées que 8 jours après infection, nous offrent un véritable aperçu du dialogue protéique entre l'hôte et la microsporidie.

Au niveau de la réponse de l'hôte, les résultats nous ont suggéré des réponses classiquement observées dans d'autres cas d'interactions hôte-pathogène. Nous avons ainsi identifié une réponse antioxydante qui se traduit dans notre cas par une surexpression de la protéine antioxydante Glutathione-S-transferase (GST) qui est une des protéines fréquemment retrouvées dans les études de protéomique (Petrak et al., 2008) ainsi que par la perturbation de l'expression de la superoxyde dismutase 2 mitochondriale (SOD2). D'un autre côté, la réponse interféron- observée à partir de J8 après infection (protéines IFITs: Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats) (Zhou et al., 2013) est une réponse originale dans le cas des

études sur les microsporidies. Cette réponse immunitaire est en effet une réponse habituellement antivirale (Zhou et al., 2013), et même si elle a déjà pu être observée dans le cas d'infections par d'autres parasites intracellulaires tels que *Plasmodium falciparum* (Pichyangkul et al., 2004) et *Listeria monocytogenes* (Stetson and Medzhitov, 2006) elle n'avait jamais été observée à ce jour dans le cas d'une infection par une microsporidie. Elle fait partie de la réponse immunitaire innée antivirale et elle est activée par la reconnaissance de différents PAMPs, en particulier des acides nucléiques simple ou double brin (ARN, ADN) par le biais des TLRs (Zhou et al., 2013). Le principal effet de ces IFIT est l'arrêt de la synthèse protéique par l'interaction avec le complexe d'initiation de la transcription 3 (EIF3)(Zhou et al., 2013) bloquant ainsi la réplication virale. Elle ne peut avoir que peu d'impact sur l'infection par un pathogène eucaryote intracellulaire, celui-ci possédant sa propre machinerie de réplication et de traduction. De plus, il a été montré dans le cas d'infections par certaines bactéries intracellulaires (en particulier *L. monocytogenes*) que le déclenchement de cette réponse impactait négativement la réponse immunitaire innée provoquant une augmentation de la multiplication bactérienne et de la létalité (Carrero, 2013). Dans le cadre de notre étude, nous suggérons que le déclenchement de cette réponse serait dû à la synthèse par le parasite de la protéine Pol Polyprotein que nous avons détectée dans notre analyse. Cette protéine issue d'un élément transposable (ET) est capable de rétro-transcrire son propre ARN messager en ADN double brin. Elle peut donc être potentiellement responsable de l'activation de la réponse interféron (INF) de type I que nous avons observée par le biais de la reconnaissance d'ADN CpG par le récepteur TLR9 dans le cytoplasme. Le fait que l'expression de ce gène semble sous le contrôle d'un promoteur d'*A. algerae* (**Chapitre IV**), nous suggère une domestication de celui-ci par la microsporidie. Cela laisse supposer que l'acquisition de cet ET aurait ainsi permis à *A. algerae* d'obtenir un avantage évolutif important pour sa survie dans la cellule hôte en détournant la réponse immunitaire vers une voie inefficace pour lutter contre ce dernier et qui d'après la littérature pourrait même favoriser le parasite (Carrero, 2013). Cette stratégie de leurre correspondrait à un nouveau mécanisme **actif d'échappement à la réponse immunitaire**.

L'expérimentation SILAC sur les cellules HFF a ainsi généré un certain nombre d'hypothèses qu'il serait intéressant de vérifier. La première étape serait de vérifier de façon directe le déclenchement de la réponse interféron par le biais du dosage des INF / . Ensuite, afin d'identifier le stimulus à l'origine du déclenchement de cette réponse, différents inhibiteurs de

TLR pourraient être utilisés, ce qui nous permettrait de confirmer ou non le rôle de l'élément transposable dans le déclenchement de la réponse et donc indirectement l'existence de cette stratégie de leurre. Cependant le fait que la Pol polyprotein soit produite en assez grande quantité pour être détectée en spectrométrie de masse et le fait que son gène soit directement sous contrôle d'un promoteur de la microsporidie rend cette hypothèse plausible. Enfin au niveau de l'impact physiologique de l'infection, il serait nécessaire de vérifier certains des effets connus des protéines IFITs, en particulier l'activation de la réponse apoptotique par le biais d'approche TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) ou Apotag, mais également l'arrêt de la transcription par le biais d'approche de PCR quantitative par exemple. Enfin, à plus long terme, des approches en ARN interférence ou de mutant nul afin d'inactiver le récepteur de l'interféron de type I (IFNAR), permettraient de conclure sur l'impact effectif de cette réponse sur la multiplication du parasite, et de conforter cette hypothèse d'une stratégie de leurre.

Les protéines parasitaires identifiées lors de la cinétique d'infection mériteraient également d'être étudiées plus en détail. En effet, la majorité des 88 protéines qui ont été identifiées présentent des fonctions biologiques attendues lors d'une phase de multiplication (croissance, métabolisme énergétique ...). Cependant, plusieurs d'entre elles sont également prédites sécrétées, dont une majorité ne présente aucune fonction ou domaine protéique connus. Ces protéines, dont certaines ont pu être détectées lors de l'infection, pourraient jouer un rôle potentiel dans la pathogénie. Il serait important, à ce titre, de vérifier leur localisation extracellulaire et en cas de confirmation, d'identifier leur rôle précis dans l'interaction avec l'hôte.

2. Niveau tissulaire – interactions *N. ceranae*-*A. mellifera* (Chapitre V et VI)

La suite de mon travail a porté sur l'étude de l'interaction hôte-parasite au niveau tissulaire. Pour cela la première étude prospective s'est centrée sur l'étude de la réponse du protéome de l'intestin de l'abeille infectée par la microsporidie *N. ceranae* à l'aide de la technique 2D-DIGE. Celle-ci nous a permis de révéler l'impact physiologique de l'infection sur l'intestin moyen de l'abeille 10 jours après l'infection.

L'analyse protéomique des spots modulés par l'infection a permis d'identifier 16 protéines dont l'expression est altérée 10 jours après l'infection. Ces résultats ont permis de confirmer la

perturbation d'un certain nombre de fonctions biologiques importantes. Ainsi, des protéines impliquées dans la réponse immunitaire sont surexprimées suite à l'infection dont une protéine PGRP (molécule de reconnaissance des peptidoglycanes microbiens) impliquée dans la reconnaissance, ainsi qu'une protéase à sérine qui joue potentiellement un rôle dans la mélanisation. L'infection semble également provoquer un stress oxydant (Thioredoxine et GST surexprimées), ce qui est cohérent avec les précédentes études ayant été menées sur ce sujet (Dussaubat et al., 2012) et qui est connu pour faire partie intégrante de la réponse immunitaire des insectes (Ryu et al., 2006). Du point de vue énergétique la surexpression de l' -glucosidase semble suggérer un stress nutritionnel qui avait déjà été observé (Mayack and Naug, 2009) et pourrait être dû à l'appropriation de ressources énergétiques par la microsporidie. Cela peut s'expliquer par le fait que les microsporidies, y compris *N. ceranae*, ne possèdent pas de « vraies » mitochondries, et sont donc dépendantes de leur hôte du point de vue énergétique (Cornman et al., 2009; Vávra and Larsson, 2014). Les abeilles seraient donc obligées afin de compenser cette perte d'ATP captée par les microsporidies en accélérant leur métabolisme énergétique, ce qui expliquerait la surexpression de l' -glucosidase. Il n'est cependant pas possible d'exclure le fait que cette accélération soit également la cause de la surproduction d'EROs.

D'une manière générale, l'infection semble provoquer un stress oxydant, qui couplé à un stress énergétique aurait un impact sur le développement de l'épithélium intestinal des abeilles infectées et qui pourrait expliquer les mortalités observées. Les abeilles infectées ne seraient plus capables de compenser efficacement la dégradation des tissus provoquée par l'infection. Cette hypothèse a été confirmée par la dernière étude qui a permis d'estimer le taux de renouvellement de l'épithélium intestinal chez des abeilles infectées au cours d'une cinétique d'infection de 21 jours. Cette étude nous a confirmé un impact réel de l'infection sur le renouvellement, celui-ci serait significativement diminué suite à l'infection. Ce résultat est renforcé par l'étude de Dussaubat et al. (2013b) dans laquelle la voie wingless, voie centrale dans le contrôle du renouvellement de l'épithélium intestinal (Xu et al., 2011), était négativement perturbée 10 jours après l'infection.

Le suivi en PCR quantitative de l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du renouvellement n'a pas permis d'expliquer complètement le phénotype observé. Cependant

l'activation de la voie Yorkie confirmée par la surexpression de la cytokine Keren laisse supposer qu'un stress est bien détecté (Figure 23) (stress oxydant, dommage aux entérocytes, ou reconnaissance directe d'un pathogène) (Biteau et al., 2011). De plus, cela semble confirmer l'activation des voies Jak-Stat et EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) qui s'activent en réponse à la cytokine *Keren* (Buchon et al., 2010). L'activation de ces voies devrait conduire à une augmentation du renouvellement de l'épithélium. Or le marquage BrdU indique une baisse du renouvellement, ce phénotype observé laisse penser que la transduction du signal d'augmentation du renouvellement par les voies Jak-Stat et EGFR est bloquée. Cette hypothèse est appuyée par la surexpression d'inhibiteurs du renouvellement qui sont détectés (*hippo*, *foxo*, *nrf2*).

Pour conclure sur cette partie, étant donné la complexité et l'imprécation des voies de signalisation entre elles, l'approche de PCR quantitative ne permet pas à elle seule d'aller plus loin dans le décryptage de la réponse. Pour contourner ce problème, nous envisageons à court terme de renouveler cette expérimentation en suivant en parallèle l'état de phosphorylation des protéines impliquées dans ces voies. Cette information nous permettra de confirmer l'état d'activation de certaines voies de signalisation étudiées, car un certain nombre des protéines possèdent des formes phosphorylées en fonction de leur état d'activation. En parallèle, la mortalité de nos abeilles semblant due à leur incapacité à compenser la dégradation de leur tissu intestinal en réponse à l'infection. Il serait intéressant d'effectuer le même genre d'analyse avec des abeilles réputées résistantes à *N. ceranae*. La comparaison des données d'expression génique, de la phosphoprotéomique et de taux de renouvellement nous permettrait de confirmer le rôle du renouvellement dans la mortalité, et le cas échéant d'identifier plus facilement le point de blocage du signal. Cela nous permettrait ainsi de contourner efficacement l'absence de mutants chez l'abeille qui est un véritable frein aux études de génétique fonctionnelle sur ce modèle.

3. Vers l'interactomique

Les trois études présentées ci-dessus ont permis d'apporter de nouvelles données intéressantes quant à l'interaction microsporidie-hôte aux niveaux cellulaire et tissulaire. Cependant, les données récoltées du côté du parasite dans ce dialogue moléculaire sont moins conséquentes. Cela est dû en grande partie à la dilution du signal protéique du parasite par rapport aux protéines majoritaires de l'hôte, mais également à l'absence d'information sur l'identité de

nombreuses protéines de microsporidie ayant des fonctions inconnues (Keeling et al., 2014). Les protéines de *N. ceranae* ne présentent par exemple que 42,8% de similarité avec celles d'*E. cuniculi*. Pour toutes ces raisons, identifier les protéines de microsporidies interagissant avec l'hôte s'avère relativement ardu. En effet l'étude SILAC nous a effectivement permis d'identifier des protéines parasites, dont certaines jouent probablement un rôle dans l'interaction avec l'hôte. Cependant, sans similarité ou domaine protéique connu, leur rôle reste difficile à définir. Afin de pallier ce problème, la solution qui nous apparait est d'aller vers des études interactomiques, c'est-à-dire identifier les interactions entre les protéines de l'hôte et celles du parasite. Dans notre cas, nous avons initié une étude en ciblant les protéines prédites sécrétées (algorithme SignalP) et extracellulaires (algorithme Psort) chez *A. algerae*, *E. cuniculi* et *N. ceranae* afin de cloner les gènes codant pour les protéines les plus intéressantes d'un point de vue interaction hôte-parasite. Le but étant par la suite, de produire des protéines recombinantes qui nous serviront tout d'abord à confirmer leur sécrétion, puis à l'aide de technique de co-immunoprécipitation à identifier les complexes protéiques de différents compartiments de l'hôte avec lesquels elles interagissent. La connaissance des complexes avec lesquels interagissent ces protéines devrait ainsi permettre de suggérer leur rôle dans l'interaction. A plus long terme, l'utilisation de SEC-PCP-SILAC (Size Exclusion Chromatography-Protein Correlation Profiling-Stable Isotope Labeling by Amino Acids in cell Culture) qui couple un triple marquage SILAC avec une purification des complexes protéiques en chromatographie d'exclusion (Kristensen et al., 2012) permettrait d'avoir accès à l'évolution des complexes protéiques piratés par le parasite (complexe de l'hôte et complexes hybrides) au cours du temps. D'une manière générale, le domaine de la protéomique a subi de profondes évolutions ces dernières années qui ont favorisé l'émergence de techniques très puissantes qui permettent de suivre l'expression et l'évolution des protéines et de leurs complexes au cours du temps. Ces nouvelles techniques qui permettraient d'apporter un éclairage sur la boîte noire que constitue le dialogue moléculaire entre un hôte et son parasite, sont pour le moment peu exploitées. En effet, hormis pour l'étude des interactions virus-hôte, où elles ont fait avancer la compréhension des stratégies de piratage, aucune étude ne les a encore utilisées dans le cadre d'interactions hôte-parasite. Elles constituent donc de formidables outils pour les futures études sur les microsporidies.

Enfin, cette thèse a permis de mieux comprendre les stratégies mises en place par les microsporidies lors de l'interaction hôte-parasite, ainsi que leur impact sur la physiologie de l'hôte. Malgré le manque de connaissances actuelles sur ces parasites, les microsporidies restent des modèles d'études intéressants, notamment concernant l'interaction moléculaire avec l'hôte. En effet, leur faible contenu en gènes, ainsi que la réduction de leurs domaines protéiques couplés avec leur très forte dépendance vis-à-vis de leurs hôtes, laisse supposer l'émergence de stratégies minimales de piratage de ces derniers. Les barrières à contourner étant les mêmes chez tous les parasites intracellulaires eucaryotes pour un même hôte, il est possible que les stratégies identifiées chez les microsporidies soient, au moins en partie, communes à d'autres pathogènes intracellulaires. L'existence de telles stratégies, laisserait ainsi entrevoir la possibilité de cibles thérapeutiques communes à l'ensemble des parasites.

CHAPITRE VIII: BIBLIOGRAPHIE

- Aizen, M. a, Harder, L.D., 2009. Geographic variation in the growth of domesticated honey bee stocks 2, 464–466. doi:10.1016/j.cub.2009.03.071.eclines
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Env. Microbiol* 12, 774–782. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x
- Alaux, C., Crauser, D., Pioz, M., Saulnier, C., Le Conte, Y., 2014. Parasitic and immune modulation of flight activity in honey bees tracked with optical counters. *J. Exp. Biol.* 217, 3416–3424. doi:10.1242/jeb.105783
- Aliferis, K.A., Copley, T., Jabaji, S., 2012. Gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. *J. Insect Physiol.* 58, 1349–59. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.07.010
- Amdam, G. V, Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1799–1802. doi:10.1073/pnas.0333979100
- Anane, S., Attouchi, H., 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 34, 450–64. doi:10.1016/j.gcb.2010.07.003
- Anderson, D.L., Trueman, J.W.H., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 165–189. doi:10.1023/A:1006456720416
- Andreadis, T.G., 1985. Experimental transmission of a microsporidian pathogen from mosquitoes to an alternate copepod host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5574–5577. doi:10.1073/pnas.82.16.5574
- Antunez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M., 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Env. Microbiol* 11, 2284–2290. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x
- Ares, A.M., Nozal, M.J., Bernal, J.L., Martin-Hernandez, R., Higes, M., Bernal, J., 2012. Liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry to evaluate juvenile hormone III levels in bee hemolymph from *Nosema spp.* infected colonies. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 899, 146–153. doi:10.1016/j.jchromb.2012.05.016
- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Vignes, B., Belzunces, L.P., Delbac, F., Blot, N., 2012. Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* 2, 326. doi:10.1038/srep00326
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., Blot, N., 2014. Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PLoS One* 9, e91686. doi:10.1371/journal.pone.0091686
- Balbani, G., 1882. Sur les microsporidies ou sporogpermies des articles. *C R Acad Sci Paris* 95, 1168–1171.

- Becnel, J.J., White, S.E., Shapiro, A.M., 2005. Review of microsporidia-mosquito relationships: From the simple to the complex. *Folia Parasitol. (Praha)*. 52, 41–50.
- Bhopale, G.M., 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 213–222. doi:10.1016/S0147-9571(02)00058-9
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, a P., Potts, S.G., Kleukers, R., Thomas, C.D., Settele, J., Kunin, W.E., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313, 351–354. doi:10.1126/science.1127863
- Biteau, B., Hochmuth, C.E., Jasper, H., 2011. Maintaining tissue homeostasis: Dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell* 9, 402–411. doi:10.1016/j.stem.2011.10.004
- Bohne, W., Böttcher, K., Groß, U., 2011. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: Biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 395–399. doi:10.1016/j.ijmm.2011.04.006
- Bommarco, R., Marini, L., Vaissière, B.E., 2012. Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape. *Oecologia* 169, 1025–1032. doi:10.1007/s00442-012-2271-6
- Botias, C., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A., Martinez-Salvador, A., De la Rua, P., Meana, A.A., Higes, M., Botías, C., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., Martínez-Salvador, A., De La Rúa, P., Meana, A.A., Higes, M., 2012. The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Res. Vet. Sci.* 93, 150–155. doi:10.1016/j.rvsc.2011.08.002
- Breeze, T.D., Bailey, a P., Balcombe, K.G., Potts, S.G., 2011. Pollination services in the UK: How important are honeybees? *Agric. Ecosyst. Environ.* 142, 137–143. doi:10.1016/j.agee.2011.03.020
- Bruneau, E., Barbancon, J.M., Bonnafe, P., Domerego, R., Fert, G., Le Conte, Y., Ratia, G., Reeb, C., Vaissiere, B., 2006. Le traité Rustica de l'apiculture, in: edition, R. (Ed.), *Le Traité Rustica de L'apiculture*. pp. 40–48.
- Buchon, N., Broderick, N. a, Kuraishi, T., Lemaitre, B., 2010. Drosophila EGFR pathway coordinates stem cell proliferation and gut remodeling following infection. *BMC Biol.* 8, 152. doi:10.1186/1741-7007-8-152
- Cali, A., Takvorian, P.M., 2014. Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia, in: *Microsporidia*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 71–133. doi:10.1002/9781118395264.ch2
- Cali, A., Takvorian, P.M., 2004. the Microsporidia: Pathology in Man and Occurrence in Nature. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 35.
- Cali, A., Weiss, L.M., Takvorian, P.M., 2002. *Brachiola algerae* spore membrane systems, their activity during extrusion, and a new structural entity, the multilayered interlaced network, associated with the polar tube and the sporoplasm. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 164–74.
- Cane, J.H., Minckley, R.L., Kervin, L.J., Roulston, T.H., Williams, N.M., 2006. Complex responses within a desert bee guild (Hymenoptera: Apiformes) to urban habitat fragmentation. *Ecol. Appl.* 16,

632–644. doi:10.1890/1051-0761(2006)016[0632:CRWADB]2.0.CO;2

- Cao, L.-F., Zheng, H.-Q., Hu, C.-Y., He, S.-Y., Kuang, H.-O., Hu, F.-L., 2012. (Hymenoptera: Apidae) from China and Neighboring Asian Areas. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 105, 298–304. doi:10.1603/AN11104
- Carrero, J.A., 2013. Confounding roles for type I interferons during bacterial and viral pathogenesis. *Int. Immunol.* doi:10.1093/intimm/dxt050
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *J. Insect Physiol.* 58, 1090–1095. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.04.016
- Charroux, B., Royet, J., 2010. *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly (Austin)*. 4, 40–47.
- Chauzat, M.-P., Faucon, J.-P., Martel, A.-C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99, 253–262. doi:10.1603/0022-0493-99.2.253
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S., 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 186–188. doi:10.1016/j.jip.2007.07.010
- Chen, Y., Evans, J.D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A.M., Pettis, J.S., 2009. Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 101, 204–209. doi:10.1016/j.jip.2009.05.012
- Combes, C., 2005. *The Art of Being a Parasite*. University of Chicago Press.
- Consortium, T.H.B.G.S., 2006. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera*. *Nature* 443, 931–949.
- Cornman, R.S., Chen, Y.P., Schatz, M.C., Street, C., Zhao, Y., Desany, B., Egholm, M., Hutchison, S., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., Evans, J.D., 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog* 5, e1000466. doi:10.1371/journal.ppat.1000466
- Corradi, N., Pombert, J.-F., Farinelli, L., Didier, E.S., Keeling, P.J., 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat. Commun.* 1, 77. doi:10.1038/ncomms1082
- Corradi, N., Selman, M., 2013. Latest progress in microsporidian genome research. *J. Eukaryot. Microbiol.* 60, 309–312. doi:10.1111/jeu.12030
- Corradi, N., Slamovits, C.H., 2011. The intriguing nature of microsporidian genomes. *Brief. Funct. Genomics* 10, 115–24. doi:10.1093/bfpg/elq032
- Cuomo, C. a, Desjardins, C. a, Bakowski, M. a, Goldberg, J., Ma, A.T., Becnel, J.J., Didier, E.S., Fan, L., Heiman, D.I., Levin, J.Z., Young, S., Zeng, Q., Troemel, E.R., 2012. Microsporidian genome

- analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome Res.* 2478–2488. doi:10.1101/gr.142802.112
- Curry, A., Canning, E.U., 1993. Human microsporidiosis. *J. Infect.* 27, 229–236. doi:10.1016/0163-4453(93)91923-D
- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P., 2012. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 981–987. doi:10.1128/AEM.06537-11
- Davenport, M.P., Loh, L., Petravic, J., Kent, S.J., 2008. Rates of HIV immune escape and reversion: implications for vaccination. *Trends Microbiol.* 16, 561–566. doi:10.1016/j.tim.2008.09.001
- de Graaf, D.C., Masschelein, G., Vandergeynst, F., De Brabander, H.F., Jacobs, F.J., 1993. In Vitro Germination of *Nosema apis* (Microspora: *Nosematidae*) Spores and Its Effect on Their - Trehalose/d-Glucose Ratio. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 220–225. doi:10.1006/jipa.1993.1103
- del Aguila, C., Izquierdo, F., Granja, a. G., Hurtado, C., Fenoy, S., Fresno, M., Revilla, Y., 2006. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *Int. J. Parasitol.* 36, 869–876. doi:10.1016/j.ijpara.2006.04.002
- Delbac, F., Duffieux, F., David, D., Metenier, G., Vivares, C.P., 1998a. Immunocytochemical identification of spore proteins in two microsporidia, with emphasis on extrusion apparatus. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 224–231.
- Delbac, F., Peyret, P., Metenier, G., David, D., Danchin, A., Vivares, C.P., 1998b. On proteins of the microsporidian invasive apparatus: complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Microbiol.* 29, 825–834.
- Desjardins, C. a., Sanscrainte, N.D., Goldberg, J.M., Heiman, D., Young, S., Zeng, Q., Madhani, H.D., Becnel, J.J., Cuomo, C. a, 2015. Contrasting host–pathogen interactions and genome evolution in two generalist and specialist microsporidian pathogens of mosquitoes. *Nat. Commun.* 6, 7121. doi:10.1038/ncomms8121
- Didier, E.S., Khan, I.A., 2014. The Immunology of Microsporidiosis in Mammals, in: *Microsporidia*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 307–325. doi:10.1002/9781118395264.ch11
- Didier, E.S., Orenstein, J.M., Aldras, a, Bertucci, D., Rogers, L.B., Janney, a, Didier, E.S., Orenstein, J. a N.M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L.B., Janney, F.A., 1995. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids . Comparison of Three Staining Methods for Detecting Microsporidia in Fluids. *J. Clin. Microbiol.* 33, 3138–3145.
- Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.-H., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F.A., Le Conte, Y., Alaux, C., 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7, e37017. doi:10.1371/journal.pone.0037017
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J.L., Plettner, E., Belzunces, L.P., Le Conte, Y., 2010. *Nosema spp.* infection alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*).

- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Crauser, D., Beslay, D., Costagliola, G., Soubeyrand, S., Kretzchmar, A., Conte, Y. Le, 2013a. Flight behavior and pheromone changes associated to *Nosema ceranae* infection of honey bee workers (*Apis mellifera*) in field conditions. J. Invertebr. Pathol. 113, 42–51.
- Dussaubat, C., Sagastume, S., Gomez-Moracho, T., Botias, C., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., Le Conte, Y., Higes, M., 2013b. Comparative study of *Nosema ceranae* (Microsporidia) isolates from two different geographic origins. Vet. Microbiol. 162, 670–678. doi:10.1016/j.vetmic.2012.09.012
- Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J., 2010. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. J. Apic. Res. 49, 134–136. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.30
- English, E.D., Adomako-Ankomah, Y., Boyle, J.P., 2015. Secreted effectors in *Toxoplasma gondii* and related species: determinants of host range and pathogenesis? Parasite Immunol. 37, 127–140. doi:10.1111/pim.12166
- Evans, J.D., Spivak, M., 2010. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 103, S62–S72. doi:10.1016/j.jip.2009.06.019
- Ferrandon, D., 2013. The complementary facets of epithelial host defenses in the genetic model organism *Drosophila melanogaster*: from resistance to resilience. Curr. Opin. Immunol. 25, 59–70. doi:10.1016/j.coi.2012.11.008
- Ferrandon, D., Imler, J.-L., Hetru, C., Hoffmann, J. a, 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. Nat. Rev. Immunol. 7, 862–874. doi:10.1038/nri2194
- Forsgren, E., 2010. European foulbrood in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 103, S5–S9. doi:10.1016/j.jip.2009.06.016
- Forsgren, E., Fries, I., 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. Vet Parasitol 170, 212–217. doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.010
- Franzen, C., 2005. How do microsporidia invade cells? Folia Parasitol. (Praha). 52, 36–40.
- Franzen, C., Fischer, S., Schroeder, J., Schölmerich, J., Schneuwly, S., 2005. Morphological and molecular investigations of *Tubulinoosema ratisbonensis* gen. nov., sp. nov. (Microsporidia: Tubulinosematidae fam. nov.), a parasite infecting a laboratory colony of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). J. Eukaryot. Microbiol. 52, 141–52. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.04-3324.x
- Franzen, C., Nasonova, E.S., Schölmerich, J., Issi, I. V., 2006. Transfer of the members of the genus *Brachiola* (Microsporidia) to the genus *Anncaliia* based on ultrastructural and molecular data. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 26–35. doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00066.x
- Fries, I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). J Invertebr Pathol 103 Suppl, S73–9. doi:10.1016/j.jip.2009.06.017

- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). EUR J PROTISTOL 32, 356–365. doi:10.1016/s0932-4739(96)80059-9
- Fraxione, E., Ruiz, L., Santillan, M., De Vargas, L. V., Tejero, J.M., Undeen, a. H., 1992. Dynamics of polar filament discharge and sporoplasm expulsion by microsporidian spores. Cell Motil. Cytoskeleton 22, 38–50. doi:10.1002/cm.970220105
- Fraxione, E., Ruiz, L., Undeen, a. H., 1994. Monovalent cations induce microsporidian spore germination in vitro. J. Eukaryot. Microbiol. 41, 464–468.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecol Econ 68, 810–821. doi:10.1016/j.ecolecon.2008.06.014
- Garibaldi, L.A., Steffan-dewenter, I., Winfree, R., Aizen, M.A., Bommarco, R., Cunningham, S.A., Kremen, C., Carvalheiro, L.G., 2014. Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. Science (80-.). 339, 1608–1611.
- Genersch, E., 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 103, S10–S19. doi:10.1016/j.jip.2009.06.015
- Giersch, T., Berg, T., Galea, F., Hornitzky, M., 2009. *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. Apidologie 40, 117–123. doi:10.1051/apido/2008065
- Gisder, S., Hedtke, K., Möckel, N., Frielitz, M.-C.C., Linde, A., Genersch, E., Mockel, N., Frielitz, M.-C.C., Linde, A., Genersch, E., Möckel, N., Frielitz, M.-C.C., Linde, A., Genersch, E., 2010. Five-year cohort study of *nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *nosema ceranae* ? Appl. Environ. Microbiol. 76, 3032–3038. doi:10.1128/AEM.03097-09
- Gluge, G., 1838. Notice sur quelques points d’anatomie pathologique comparée, suivie de quelques observations sur la structure des branchies dans épinoches. Bull Acad R Belg 5, 771–785.
- Goblirsch, M., Huang, Z.Y., Spivak, M., 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. PLoS One 8, e58165. doi:10.1371/journal.pone.0058165
- Goldberg, A. V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirt, R.P., Lill, R., Embley, T.M., 2008. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. Nature 452, 624–628. doi:10.1038/nature06606
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science (80-.). doi:10.1126/science.1255957
- Greenwood, B.M., Fidock, D. a, Kyle, D.E., Kappe, S.H.I., Alonso, P.L., Collins, F.H., Duffy, P.E., 2008. Review series Malaria: progress , perils , and prospects for eradication 118. doi:10.1172/JCI33996.1266
- Grixti, J.C., Wong, L.T., Cameron, S. a., Favret, C., 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North

- American Midwest. Biol. Conserv. 142, 75–84. doi:10.1016/j.biocon.2008.09.027
- Haag, K.L., James, T.Y., Pombert, J.-F., Larsson, R., Schaer, T.M.M., Refardt, D., Ebert, D., 2014. Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 15480–5. doi:10.1073/pnas.1410442111
- Hacker, C., Howell, M., Bhella, D., Lucocq, J., 2014. Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: Direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. Cell. Microbiol. 16, 565–579. doi:10.1111/cmi.12240
- Hayman, J.R., Southern, T.R., Nash, T.E., 2005. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. Infect. Immun. 73, 841–848. doi:10.1128/IAI.73.2.841-848.2005
- Heinz, E., Williams, T.A., Nakjang, S., Noël, C.J., Swan, D.C., Goldberg, A. V, Harris, S.R., Weinmaier, T., Markert, S., Becher, D., Bernhardt, J., Dagan, T., Hacker, C., Lucocq, J.M., Schweder, T., Rattei, T., Hall, N., Hirt, R.P., Embley, T.M., 2012. The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. PLoS Pathog. 8, e1002979. doi:10.1371/journal.ppat.1002979
- Heinze, J., Rüppell, O., Foitzik, S., Buschinger, A., 1998. First records of *Leptothorax rugatulus* (Hymenoptera: Formicidae) with cysticercoids of tapeworms (Cestoda: Dilepididae) from the southwestern United States. Florida Entomol. 81, 122–125. doi:http://www.fcla.edu/FlaEnt/
- Hickling, R., Roy, D.B., Hill, J.K., Fox, R., Thomas, C.D., 2006. The distributions of a wide range of taxonomic groups are expanding polewards. Glob. Chang. Biol. 12, 450–455. doi:10.1111/j.1365-2486.2006.01116.x
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Botias, C., Meana, A., Martin-Hernandez, R., 2010a. The differential development of microsporidia infecting worker honey bee (*Apis mellifera*) at increasing incubation temperature. Environ. Microbiol. Rep. 2, 745–748. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00170.x
- Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., Meana, A., 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J Invertebr Pathol 94, 211–217. doi:10.1016/j.jip.2006.11.001
- Higes, M., Juarranz, A., Dias-Almeida, J., Lucena, S., Botias, C., Meana, A., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., 2013a. Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). Environ. Microbiol. Rep. 5, 530–536. doi:10.1111/1758-2229.12059
- Higes, M., Martin, R., Meana, A., 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. J Invertebr Pathol 92, 93–95. doi:10.1016/j.jip.2006.02.005
- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E.G., Gonzalez-Porto, A. V, Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jimenez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Env. Microbiol 10, 2659–2669. doi:10.1111/j.1462-

- Higes, M., Martin-Hernandez, R., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A. V, Garcia-Palencia, P., Meana, A., Del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L., 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. Environ. Microbiol. Rep. 1, 110–113. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Martínez-Salvador, A., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A.V., Meana, A., Bernal, J.L., Del Nozal, M.J., Bernal, J., 2010b. A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. Environ. Microbiol. Rep. 2, 243–50. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00099.x
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2010c. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. Apidologie 41, 375–392. doi:10.1051/apido/2010019
- Higes, M., Meana, A.A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., Bartolome, C., Botias, C., Martin-Hernandez, R., 2013b. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. Environ. Microbiol. Rep. 5, 17–29. doi:10.1111/1758-2229.12024
- Hoffmann, J. a, 2003. The immune response of Drosophila. Nature 426, 33–38. doi:10.1038/nature02021
- Hovatta, O., Mikkola, M., Gertow, K., Strömberg, A.M., Inzunza, J., Hreinsson, J., Rozell, B., Blennow, E., Andäng, M., Ährlund-Richter, L., 2003. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Hum. Reprod. 18, 1404–1409. doi:10.1093/humrep/deg290
- Huang, W.-F., Jiang, J.-H., Chen, Y.-W., Wang, C.-H., 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. Apidologie 38, 30–37. doi:10.1051/apido:2006054
- Huang, Z.Y., Robinson, G.E., 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. Behav. Ecol. Sociobiol. 39, 147–158. doi:10.1007/s002650050276
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Metenier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivares, C.P., 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature 414, 450–453. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6862/supinfo/414450a0_S1.html
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Front. Immunol. 5, 1–9. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Keeling, P., 2009. Five questions about microsporidia. PLoS Pathog 5. doi:10.1371/journal.ppat.1000489
- Keeling, P.J., Corradi, N., Morrison, H.G., Haag, K.L., Ebert, D., Weiss, L.M., Akiyoshi, D.E., Tzipori, S., 2010. The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* lacks genes for core carbon metabolism. Genome Biol. Evol. 2, 304–309. doi:10.1093/gbe/evq022
- Keeling, P.J., Fast, N.M., 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. Annu Rev Microbiol 56, 93–116. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160854

- Keeling, P.J., Fast, N.M., Corradi, N., 2014. Microsporidian Genome Structure and Function, in: Microsporidia. John Wiley & Sons, Inc., pp. 221–229. doi:10.1002/9781118395264.ch7
- Keeling, P.J., Slamovits, C.H., 2004. Simplicity and complexity of microsporidian genomes. *Eukaryot. Cell* 3, 1363–1369. doi:10.1128/EC.3.6.1363-1369.2004
- Kennedy, A.D., DeLeo, F.R., 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.* 43, 25–61. doi:10.1007/s12026-008-8049-6
- Klee, J., Besana, A.M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D.Q., Chinh, T.X., Puerta, F., Ruz, J.M., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., Paxton, R.J., 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 96, 1–10. doi:10.1016/j.jip.2007.02.014
- Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. a, Kremen, C., Tscharncke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.* 274, 303–313. doi:10.1098/rspb.2006.3721
- Koudela, B., Visvesvara, G.S., Moura, H., Vávra, J., 2001. The human isolate of *Brachiola algerae*(Phylum Microspora): development in SCID mice and description of its fine structure features. *Parasitology* 123, 153–62.
- Kralj, J., Fuchs, S., 2009. *Nosema sp.* influences flight behavior of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* 41, 21–28. doi:10.1051/apido/2009046
- Krebes, L., Blank, M., Frankowski, J., Bastrop, R., 2010. Molecular characterisation of the Microsporidia of the amphipod *Gammarus duebeni* across its natural range revealed hidden diversity, wide-ranging prevalence and potential for co-evolution. *Infect. Genet. Evol.* 10, 1027–38. doi:10.1016/j.meegid.2010.06.011
- Kristensen, A.R., Gsponer, J., Foster, L.J., 2012. A high-throughput approach for measuring temporal changes in the interactome. *Nat Methods* 9, 907–909. doi:10.1038/nmeth.2131
- Labbé, A., 1899. Microsporidiida, in: *Das Tierreich* Vol. 5. Sporozoa. Berlin, pp. 104–112.
- Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Kuris, A.M., 2006. Parasites dominate food web links. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11211–11216.
- Le Conte, Y., Navajas, M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev. Sci. Tech.* 27, 485–497, 499–510.
- Leitch, G.J., Ceballos, C., 2008. Effects of host temperature, and gastric and duodenal environments on microsporidia spore germination and infectivity of intestinal epithelial cells. *Parasitol. Res.* doi:10.1007/s00436-008-1156-4
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25, 697–743. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615
- Liu, H., Yuan, Y., Guo, H., Mitchelson, K., Zhang, K., Xie, L., Qin, W., Lu, Y., Wang, J., Guo, Y., Zhou, Y., He, F., 2012. Hepatitis B virus encoded X protein suppresses apoptosis by inhibition of the

- caspase-independent pathway. *J Proteome Res* 11, 4803–4813. doi:10.1021/pr2012297
- Lom, J., Nilsen, F., 2003. Fish microsporidia: Fine structural diversity and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 33, 107–127. doi:10.1016/S0020-7519(02)00252-7
- Lucas, S.B., Papadaki, L., Conlon, C., Sewankambo, N., Goodgame, R., Serwadda, D., 1989. Diagnosis of intestinal microsporidiosis in patients with AIDS. *J. Clin. Pathol.* 42, 885–7.
- Lu in, P., Mahmutefendi , H., Blagojevi Zagorac, G., Ili Tomaš, M., 2014. Cytomegalovirus immune evasion by perturbation of endosomal trafficking. *Cell. Mol. Immunol.* 154–169. doi:10.1038/cmi.2014.85
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailon, E., Higes, M., 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6331–6338. doi:10.1128/AEM.00270-07
- Mayack, C., Naug, D., 2010. Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect Physiol.* 56, 1572–5. doi:10.1016/j.jinsphys.2010.05.016
- Mayack, C., Naug, D., 2009. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *J Invertebr Pathol* 100, 185–188. doi:10.1016/j.jip.2008.12.001
- Meissner, E.G., Bennett, J.E., Qvarnstrom, Y., da Silva, A., Chu, E.Y., Tsokos, M., Gea-Banacloche, J., 2012. Disseminated microsporidiosis in an immunosuppressed patient. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1155–8. doi:10.3201/eid1807.120047
- Milbrath, M.O., Tran, T. Van, Huang, W., Solter, L.F., Tarpy, D.R., Lawrence, F., Huang, Z.Y., 2015. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.* 125, 9–15. doi:10.1016/j.jip.2014.12.006
- Mitchell, C.E., Agrawal, A. a., Bever, J.D., Gilbert, G.S., Hufbauer, R. a., Klironomos, J.N., Maron, J.L., Morris, W.F., Parker, I.M., Power, A.G., Seabloom, E.W., Torchin, M.E., Vázquez, D.P., 2006. Biotic interactions and plant invasions. *Ecol. Lett.* 9, 726–740. doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00908.x
- Monaghan, S.R., Rumney, R.L., Vo, N.T.K., Bols, N.C., Lee, L.E.J., 2011. In vitro growth of microsporidia *Anncaliia algerae* in cell lines from warm water fish. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* 47, 104–113. doi:10.1007/s11626-010-9366-3
- Münch, D., Amdam, G. V., Wolschin, F., 2008. Ageing in a eusocial insect: Molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Funct. Ecol.* 22, 407–421. doi:10.1111/j.1365-2435.2008.01419.x
- Mutinelli, F., 2011. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Rev. Sci. Tech.* 30, 257–271.
- Nägeli, C.W. von, 1857. Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Zeitung* 15, 760–761.
- Nathan, C., Cunningham-Bussel, A., 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist’s guide to reactive

- oxygen species. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 349–61. doi:10.1038/nri3423
- Nathan, C., Shiloh, M.U., 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8841–8848. doi:10.1073/pnas.97.16.8841
- Naug, D., 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biol. Conserv.* 142, 2369–2372. doi:10.1016/j.biocon.2009.04.007
- Naug, D., Gibbs, A., 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 40, 595–599. doi:10.1051/apido/2009039
- Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G. V., 2007. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* 5, 0673–0677. doi:10.1371/journal.pbio.0050062
- Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G., 2005. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 293–305. doi:10.1128/CMR.18.2.293
- Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326. doi:10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x
- Olsen, P.E., Rice, W. a., Liu, T.P., 1986. In vitro germination of *Nosema apis* spores under conditions favorable for the generation and maintenance of sporoplasms. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 65–73. doi:10.1016/0022-2011(86)90164-3
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376–386.
- Palmer, L.E., Hobbie, S., Galán, J.E., Bliska, J.B., 1998. YopJ of *Yersinia pseudotuberculosis* is required for the inhibition of macrophage TNF- production and downregulation of the MAP kinases p38 and JNK. *Mol. Microbiol.* 27, 953–965. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00740.x
- Pan, G., Xu, J., Li, T., Xia, Q., Liu, S.-L., Zhang, G., Li, S., Li, C., Liu, H., Yang, L., Liu, T., Zhang, X., Wu, Z., Fan, W., Dang, X., Xiang, H., Tao, M., Li, Y., Hu, J., Li, Z., Lin, L., Luo, J., Geng, L., Wang, L., Long, M., Wan, Y., He, N., Zhang, Z., Lu, C., Keeling, P.J., Wang, J., Xiang, Z., Zhou, Z., 2013. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics* 14, 186. doi:10.1186/1471-2164-14-186
- Paudel, Y.P., Mackereth, R., Hanley, R., Qin, W., 2015. Honey Bees (*Apis mellifera* L.) and Pollination Issues: Current status, impacts and potential drivers of decline. *J. Agric. Sci.* 7, 93–109. doi:10.5539/jas.v7n6p93
- Paxton, R.J., Klee, J., Korpela, S., Fries, I., 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 558–565. doi:10.1051/apido:2007037

- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., Vulpe, C.D., 2008. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8, 1744–1749. doi:10.1002/pmic.200700919
- Peyretilade, E., El Alaoui, H., Diogon, M., Polonais, V., Parisot, N., Biron, D.G., Peyret, P., Delbac, F., 2011. Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Res. Microbiol.* 162, 598–606. doi:10.1016/j.resmic.2011.03.004
- Peyretilade, E., Parisot, N., Polonais, V., Terrat, S., Denonfoux, J., Dugat-Bony, E., Wawrzyniak, I., Biderre-Petit, C., Mahul, A., Rimour, S., Gonçalves, O., Bornes, S., Delbac, F., Chebance, B., Duprat, S., Samson, G., Katinka, M., Weissenbach, J., Wincker, P., Peyret, P., 2012. Annotation of microsporidian genomes using transcriptional signals. *Nat. Commun.* 3, 1137. doi:10.1038/ncomms2156
- Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Kum-arb, U., Hemmi, H., Akira, S., Krieg, A.M., Heppner, D.G., Stewart, V.A., Hasegawa, H., Looareesuwan, S., Shanks, G.D., Miller, R.S., 2004. Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *J. Immunol.* 172, 4926–33.
- Polonais, V.V., Belkorchia, A., Roussel, M.M., Peyretilade, E., Peyret, P., Diogon, M., Delbac, F.F., 2013. Identification of two new polar tube proteins related to polar tube protein 2 in the microsporidian *Antonosporea locustae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 346, 36–44. doi:10.1111/1574-6968.12198
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol Evol* 25, 345–353. doi:10.1016/j.tree.2010.01.007
- Rader, R., Howlett, B.G., Cunningham, S. a., Westcott, D. a., Edwards, W., 2012. Spatial and temporal variation in pollinator effectiveness: Do unmanaged insects provide consistent pollination services to mass flowering crops? *J. Appl. Ecol.* 49, 126–134. doi:10.1111/j.1365-2664.2011.02066.x
- Robinson, G.E., Vargo, E.L., 1997. Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35, 559–583. doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1997)35:4<559::AID-ARCH13>3.0.CO;2-9
- Rönnebäumer, K., Gross, U., Bohne, W., 2008. The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryot. Cell* 7, 1001–1008. doi:10.1128/EC.00004-08
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S96–S119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016
- Rueppell, O., Hayworth, M.K., Ross, N.P., 2010. Altruistic self-removal of health-compromised honey bee workers from their hive. *J. Evol. Biol.* 23, 1538–1546. doi:10.1111/j.1420-9101.2010.02022.x
- Ruttner, F., 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-72649-1

- Ryu, J.-H., Ha, E.-M., Oh, C.-T., Seol, J.-H., Brey, P.T., Jin, I., Lee, D.G., Kim, J., Lee, D., Lee, W.-J., 2006. An essential complementary role of NF-kappaB pathway to microbicidal oxidants in *Drosophila* gut immunity. *EMBO J.* 25, 3693–701. doi:10.1038/sj.emboj.7601233
- Sanders, J.L., Watral, V., Kent, M.L., 2012. Microsporidiosis in zebrafish research facilities. *ILAR J.* 53, 106–13. doi:10.1093/ilar.53.2.106
- Scanlon, M., Leitch, G.J., Visvesvara, G.S., Shaw, A.P., 2004. Relationship between the host cell mitochondria and the parasitophorous vacuole in cells infected with *Encephalitozoon* microsporidia. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51, 81–7.
- Scanlon, M., Shaw, a P., Zhou, C.J., Visvesvara, G.S., Leitch, G.J., 2000. Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47, 525–531.
- Schmid-Hempel, P., 2011. *Evolutionary parasitology : the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics / by Paul Schmid-Hempel.* Oxford University Press, Oxford.
- Schmid-Hempel, P., 2009. Immune defence, parasite evasion strategies and their relevance for “macroscopic phenomena” such as virulence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 85–98. doi:10.1098/rstb.2008.0157
- Schwartz, C., Villemant, C., Rome, Q., Muller, F., 2012. *Vespa velutina* (frelon asiatique) : Un nouvel hyménoptère en France. *Rev. Fr. Allergol.* 52, 397–401. doi:10.1016/j.reval.2012.06.002
- Shadduck, J.A., 1989. Human Microsporidiosis and AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 11, 203–207. doi:10.1093/clinids/11.2.203
- Shaw, R.W., Kent, M.L., Brown, a M., Whipps, C.M., Adamson, M.L., 2000. Experimental and natural host specificity of *Loma salmonae* (Microsporidia). *Dis. Aquat. Organ.* 40, 131–6. doi:10.3354/dao040131
- Shertz, C. a, Bastidas, R.J., Li, W., Heitman, J., Cardenas, M.E., 2010. Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. *BMC Genomics* 11, 510. doi:10.1186/1471-2164-11-510
- Sibley, L.D., 2011. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. *Immunol Rev* 240, 72–91. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00990.x
- Smith, M.L., 2012. The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? *PLoS One* 7, e43319. doi:10.1371/journal.pone.0043319
- Solter, L.F., 2010. Managed pollinator CAP-coordinated agricultural project: Microsporidia: Friend, foe (and intriguing creatures). *Am. bee J.*
- Staveley, J.P., Law, S. a, Fairbrother, A., Menzie, C. a, 2014. A Causal Analysis of Observed Declines in Managed Honey Bees (*Apis mellifera*). *Hum. Ecol. Risk Assess.* 20, 566–591. doi:10.1080/10807039.2013.831263
- Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Feist, S.W., Chambers, E., Stone, D.M., 2013. Plastic parasites: Extreme dimorphism creates a taxonomic conundrum in the phylum Microsporidia. *Int. J. Parasitol.* 43, 339–

- Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Small, H.J., Moss, J., Shields, J.D., Reece, K.S., Tuck, I., 2010. *Myospora metanephrops* (n. g., n. sp.) from marine lobsters and a proposal for erection of a new order and family (*Crustaceacida; Myosporidae*) in the Class *Marinosporidia* (Phylum *Microsporidia*). *Int. J. Parasitol.* 40, 1433–1446. doi:10.1016/j.ijpara.2010.04.017
- Stetson, D.B., Medzhitov, R., 2006. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93–103. doi:10.1016/j.immuni.2005.12.003
- Steullet, P., Guerin, P.M., 1994. Identification of vertebrate volatiles stimulating olfactory receptors on tarsus I of the tick *Amblyomma variegatum Fabricius (Ixodidae)*. I. Receptors within the Haller's organ capsule. *J. Comp. Physiol. A.* 174, 27–38. doi:10.1007/BF00192004
- Stockdale, C., Swiderski, M.R., Barry, J.D., McCulloch, R., 2008. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: Joining the DOTs. *PLoS Biol.* 6, 1386–1391. doi:10.1371/journal.pbio.0060185
- Szumowski, S.C., Estes, K. a, Troemel, E.R., 2012. Preparing a discreet escape. *Worm* 207–211.
- Takvorian, P.M., Weiss, L.M., Cali, A., 2005. The early events of *Brachiola algerae* (Microsporidia) infection: spore germination, sporoplasm structure, and development within host cells. *Folia Parasitol. (Praha)*. 52, 118–29.
- Tang, H., 2009. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 3, 105–11.
- Taupin, V., Garenaux, E., Mazet, M., Maes, E., Denise, H., Prensier, G., Vivarès, C.P., Guérardel, Y., Méténier, G., 2007. Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing -1,2 linkages. *Glycobiology* 17, 56–67. doi:10.1093/glycob/cwl050
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Bagny, L., Fievet, J., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M., 2006. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. *Apidologie* 37, 41–50. doi:10.1051/apido
- Texier, C., Vidau, C., Vignes, B., El Alaoui, H., Delbac, F., 2010. Microsporidia: a model for minimal parasite-host interactions. *Curr Opin Microbiol* 13, 443–449. doi:10.1016/j.mib.2010.05.005
- Theron, A., Combes, C., 1995. Asynchrony of Infection Timing, Habitat Preference, and Sympatric Speciation of Schistosome Parasites. *Evolution (N. Y)*. 49, 372–375 CR – Copyright © 1995 Society for th. doi:10.2307/2410347
- Thirumalai, K., Kim, K.S., Zychlinsky, A., 1997. IpaB, a *Shigella flexneri* invasin, colocalizes with interleukin-1 - converting enzyme in the cytoplasm of macrophages. *Infect. Immun.* 65, 787–793.
- Tourtip, S., Wongtripop, S., Stentiford, G.D., Bateman, K.S., Sriurairatana, S., Chavadej, J., Sritunyalucksana, K., Withyachumnarnkul, B., 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae)*, a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon (Decapoda: Penaeidae)*: Fine structure and phylogenetic relationships. *J. Invertebr. Pathol.* 102, 21–29. doi:10.1016/j.jip.2009.06.004

- Traver, B.E., Fell, R.D., 2011. Prevalence and infection intensity of *Nosema* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Virginia. *J. Invertebr. Pathol.* 107, 43–9. doi:10.1016/j.jip.2011.02.003
- Troemel, E.R., Félix, M.-A., Whiteman, N.K., Barrière, A., Ausubel, F.M., 2008. Microsporidia are natural intracellular parasites of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 6, 2736–2752. doi:10.1371/journal.pbio.0060309
- Tsaousis, A.D., Kunji, E.R.S., Goldberg, A. V, Lucocq, J.M., Hirt, R.P., Embley, T.M., 2008. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 453, 553–556. doi:10.1038/nature06903
- Undeen, A.H., Frixione, E., 1990. The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. *J. Protozool.* 37, 561–7.
- vanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y., Underwood, R., Tarpy, D.R., Pettis, J.S., 2009. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS One* 4, e6481. doi:10.1371/journal.pone.0006481
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R.M., Pettis, J., 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3, e4071. doi:10.1371/journal.pone.0004071
- vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J Invertebr Pathol* 103, S80–95. doi:10.1016/j.jip.2009.06.011
- Vavra, J., 1976. Structure of the microsporidia. *Comp. Pathobiol.* 1, 1–85.
- Vávra, J., Larsson, J.I.R., 2014. Structure of Microsporidia, in: *Microsporidia*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–70. doi:10.1002/9781118395264.ch1
- Vavra, J., Undeen, A.H., 1970. *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporida) a Pathogen in a Laboratory Colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). *J. Protozool.* 17, 240–249. doi:10.1111/j.1550-7408.1970.tb02365.x
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Vigues, B., Brunet, J.-L.L., Texier, C., Biron, D.G., Blot, N., El Alaoui, H., Belzunces, L.P., Delbac, F., 2011. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6, e21550. doi:10.1371/journal.pone.0021550
- Villemant, C., Haxaire, J., Streito, J., 2006. Premier bilan de l’invasion de *Vespa velutina* Lepeletier en France (Hymenoptera, Vespidae). *Bull. la Société Entomol. Fr.* 111, 535–538.
- Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck, B. a., 2005. Molecular phylogeny of the Microsporidia: Ecological, ultrastructural and taxonomic considerations. *Folia Parasitol. (Praha).* 52, 131–142.
- Wang, J.-Y., Chambon, C., Lu, C.-D., Huang, K.-W., Vivares, C.P., Texier, C., 2007. A proteomic-based approach for the characterization of some major structural proteins involved in host-parasite relationships from the silkworm parasite *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics* 7, 1461–1472. doi:10.1002/pmic.200600825

- Watts, M.R., Chan, R.C.F., Cheong, E.Y.L., Brammah, S., Clezy, K.R., Tong, C., Marriott, D., Webb, C.E., Chacko, B., Tobia, V., Outhred, A.C., Field, A.S., Prowse, M. V., Bertouch, J. V., Stark, D., Reddel, S.W., 2014. *Anncaliia algerae* microsporidial myositis. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 185–191. doi:10.3201/eid2002.131126
- Weidner, E., 1982. The microsporidian spore invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *J. Cell Biol.* 93, 976–979. doi:10.1083/jcb.93.3.976
- Weidner, E., Byrd, W., 1982. The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *J. Cell Biol.* 93, 970–975. doi:10.1083/jcb.93.3.970
- Wilson-Rich, N., Spivak, M., Fefferman, N.H., Starks, P.T., 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 405–423. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093301
- Wittner, M., Tanowitz, H.B., Keohane, E., Weiss, L.M., 1998. *Brachiola vesicularum*, J. Eukaryot. microbiology 45, 240–251.
- Xu, N., Wang, S.Q., Tan, D., Gao, Y., Lin, G., Xi, R., 2011. EGFR, Wingless and JAK/STAT signaling cooperatively maintain *Drosophila* intestinal stem cells. *Dev. Biol.* 354, 31–43. doi:10.1016/j.ydbio.2011.03.018
- Yoshiyama, M., Kimura, K., 2011. Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 263–267. doi:10.1016/j.jip.2010.10.010
- Youssef, N.N., Hammond, D.M., 1971. The fine structure of the developmental stages of the microsporidian *Nosema apis* Zander. *Tissue Cell* 3, 283–294.
- Zander, E., 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* 31, 196–204.
- Zayed, A., Whitfield, C.W., 2008. A genome-wide signature of positive selection in ancient and recent invasive expansions of the honey bee *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3421–6. doi:10.1073/pnas.0800107105
- Zhou, X., Michal, J.J., Zhang, L., Ding, B., Lunney, J.K., Liu, B., Jiang, Z., 2013. Interferon induced IFIT family genes in host antiviral defense. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 200–8. doi:10.7150/ijbs.5613

CHAPITRE IX: ANNEXE

Microsporidian Genomes Harbor a Diverse Array of Transposable Elements that Demonstrate an Ancestry of Horizontal Exchange with Metazoans

Nicolas Parisot^{1,2,†}, Adrian Pelin^{3,†}, Cyrielle Gasc¹, Valérie Polonais^{2,4}, Abdel Belkorchia^{2,4}, Johan Panek^{2,4}, Hicham El Alaoui^{2,4}, David G. Biron^{2,4}, Émilie Brasset⁵, Chantal Vauray⁵, Pierre Peyret¹, Nicolas Corradi^{3,*}, Éric Peyretailade^{1,*}, and Emmanuelle Lerat^{6,*}

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4678 CIDAM, Clermont-Ferrand, France

²CNRS, UMR 6023, LMGE, Aubière, France

³Canadian Institute for Advanced Research, Department of Biology, University of Ottawa, Ontario, Canada

⁴Clermont Université, Université d'Auvergne, Laboratoire "Microorganismes: Génome et Environnement," Clermont-Ferrand, France

⁵Clermont Université, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France, Inserm; U 1103, Clermont-Ferrand, France, CNRS; UMR 6293, Clermont-Ferrand, France

⁶Université de Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, F-69622 Villeurbanne, France

*Corresponding author: E-mail: ncorradi@uottawa.ca; eric.peyretailade@udamail.fr; emmanuelle.lerat@univ-lyon1.fr.

[†]These authors contributed equally to this work.

Accepted: August 12, 2014

Abstract

Microsporidian genomes are the leading models to understand the streamlining in response to a pathogenic lifestyle; they are gene-poor and often possess small genomes. In this study, we show a feature of microsporidian genomes that contrasts this pattern of genome reduction. Specifically, genome investigations targeted at *Anncalia algerae*, a human pathogen with a genome size of 23 Mb, revealed the presence of a hitherto undetected diversity in transposable elements (TEs). A total of 240 TE families per genome were identified, exceeding that found in many free-living fungi, and searches of microsporidian species revealed that these mobile elements represent a significant portion of their coding repertoire. Their phylogenetic analysis revealed that many cases of ancestry involve recent and bidirectional horizontal transfers with metazoans. The abundance and horizontal transfer origin of microsporidian TEs highlight a novel dimension of genome evolution in these intracellular pathogens, demonstrating that factors beyond reduction are at play in their diversification.

Key words: microsporidia, transposable elements, diversity, genome evolution, horizontal transfers.

Introduction

Microsporidia are a group of obligate intracellular parasites composed of over 1,500 species and over 187 genera (Vavra and Lukes 2013), which have been recently associated with a phylum closely related to the fungal kingdom, the Cryptomycota (James et al. 2013). These organisms are ubiquitous and able to infect potentially all animal phyla, particularly insects but also humans, so these parasites are considered both medically and ecologically relevant (Vavra and Lukes 2013). Obligate intracellular lifestyle in microsporidia resulted in severe reduction of their genomes and cells complexity, which, for example, now lacks conventional mitochondria

and Golgi apparatus (Didier et al. 2009; Vavra and Lukes 2013). Microsporidian genomes sequenced to date encode few known protein coding genes compared with other eukaryotes, so most members have a minimal metabolic networks and rely on several key transporters to stealing metabolites from their hosts' cell, including molecular sources of energy (Nakjang et al. 2013). Interestingly, although the biochemical repertoire of microsporidia is universally reduced, the genome size within the group can vary over 10-fold (2.3–24 Mb) (Corradi et al. 2009, 2010), so variation in genome size in this group is not necessarily correlated with significant improvements in metabolic capabilities, but rather with an

expansion in the size of noncoding regions (i.e., larger intergenic regions), as well as the number of transposable elements (TEs) and other DNA repeats (Corradi et al. 2009; Peyretailade et al. 2012; Pan et al. 2013). Indeed, TEs are found and characterized in microsporidia with comparatively large genomes, including *Nosema* spp., *Hamiltosporidium tvaerminnensis*, and *Anncalia algerae*, but are typically absent in species with smaller genomes, such as *Enterocytozoon bieneusi* and species in the genus *Encephalitozoon* (Katinka et al. 2001; Akiyoshi et al. 2009; Corradi et al. 2010; Keeling et al. 2010; Pombert et al. 2012). To date, no studies have looked at the overall diversity of TEs in these pathogens, and their potential impact on their ecology and evolution.

TEs are repeated sequences that usually represent a substantial part of the fungal (3–20%) and metazoan (0.13–50%) genomes (Daboussi and Capi 2003; Hua-Van et al. 2005; Wicker et al. 2007; Wang et al. 2010; Sun et al. 2012). Among these, two major classes are generally recognized, including Class I elements (i.e., retrotransposons), which can move through a reverse-transcribed RNA intermediate and are subdivided into two subclasses according to the presence or absence of Long Terminal Repeat (LTR) sequences at their extremities, and Class II elements (i.e., DNA transposons) that can transpose directly under the form of DNA intermediate (Wicker et al. 2007). In most genomes, TEs can rapidly multiply, resulting in several structural changes, including chromosomal rearrangements, pseudogenizations, and gene shuffling (Biemont 2010) that are often deleterious. In few cases, however, the presence of TEs can also benefit an organism, notably by modulating the expression of neighboring genes or by creating genomic diversity in regions that are important in host–parasite interactions—that is, antigens, effectors (Raffaele and Kamoun 2012).

TEs also have a high propensity for horizontal transfers (HTs) (Loreto et al. 2008); an HT is the nonsexual exchange of DNA between organisms that are not necessarily related. Similar events involving TEs were reported from a variety of lineages, including plants, mammals, insects, and unicellular eukaryotes such as microsporidia (Yoshiyama et al. 2001; Steglich and Schaeffer 2006; Laha et al. 2007; Fortune et al. 2008; Hecht et al. 2010; Heinz et al. 2012; Wallau et al. 2012; Ivancevic et al. 2013; El Baidouri et al. 2014; Zhang et al. 2014), but little is known about the cellular mechanisms involved in such transfers (Gilbert et al. 2010b). Nevertheless, some studies proposed that the intimacy of parasitism (direct host–parasite interaction) could promote HT of TEs across phyla like between vertebrates and invertebrates (Gilbert et al. 2010a; Gilbert et al. 2010b). In microsporidia, the genetic/cellular intimacy arising from intracellular parasitism has fuelled a number of HTs (Corradi and Selman 2013), but intriguingly only few of these have involved TEs (Heinz et al. 2012; Pan et al. 2013). The rarity of HTs involving TEs in these species may represent a real biological barrier to transfer, but could also reflect the poor annotation of these elements in genome sequences from this

group because in the multicellular eukaryotes, the HT of TEs usually outnumbers those involving protein encoding genes (Schaack et al. 2010). To differentiate these two scenarios, and thus better understand the diversity and role of TEs in these parasites, we conducted an exhaustive search for TEs across all publicly available microsporidian genomes, with a particular focus on a species with one of the largest genomes known in the group (23 Mb), the human pathogen *An. algerae* (Belkorchia et al. 2008). Our analyses demonstrated that TE families can be present in surprisingly large numbers in microsporidia, and that some of these have been involved in HT between the animals (possibly the hosts) and microsporidia; possibly in both directions.

Materials and Methods

Sequence Data from Complete Genomes

Genome Data from *An. algerae*

The contig sequences obtained from *An. algerae* (Peyretailade et al. 2012) were searched using BLASTX (Altschul et al. 1997) against the nonredundant GenBank database to determine matches to proteins from TEs. We selected 1,785 contigs containing domains supposedly corresponding to TE sequences and clustered them using BLASTclust (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/documents/blastclust.html>, last accessed September 1, 2014) with the following parameters: 90% of identity and 60% of coverage. We obtained 903 clusters (size ranges from 1 to 24 sequences). For each cluster of size superior to 1, the sequences were aligned using MUSCLE (Edgar 2004) and used to build a consensus. This consensus was then used as query for a BLASTN against all the *An. algerae* contigs to retrieve sequences with over 90% of identity over a length of more than 200 bp. The contig sequences were then aligned using MUSCLE and a new consensus sequence was reconstructed to likely represent a complete TE sequence. For each consensus, the presence of Open Reading Frame(s) (ORF) and the presence of LTR or Terminal Inverted Repeat (TIR) sequences were detected using ORF Finder (Sayers et al. 2011) and bl2seq (Altschul et al. 1997), respectively. In total, 240 different consensus corresponding to different TE families from various types (LTR retrotransposons and DNA transposons) were obtained (supplementary table S1 and file S1, Supplementary Material online). The occurrences of each family were determined using RepeatMasker (Smit et al. 1996–2010) on the sequenced genomes of *An. algerae* with the consensus sequences used as library, and the copy numbers were computed using the tool One_code_to_find_them_all (Bailly-Bechet et al. 2014) (supplementary table S2, Supplementary Material online).

Data from Other Microsporidia

Available microsporidian genomes (16) were retrieved: *Edhazardia aedis* USNM 41457 (AFBI00000000.2),

Encephalitozoon cuniculi EC1 (AEWD00000000.1), *Enc. cuniculi* EC2 (AEWQ00000000.1), *Enc. cuniculi* EC3 (AEWR00000000.1), *Enc. cuniculi* GB-M1 (AL391737.2; AL590442.1–AL590451.1), *Encephalitozoon hellem* ATCC 50504 (CP002713.1–CP002724.1), *Encephalitozoon intestinalis* ATCC 50506 (CP001942.1–CP001952.1), *Encephalitozoon romaleae* SJ-2008 (CP003518.1–CP003530.1), *Ent. bienersi* H348 (NZ_ABGB00000000.1), *Ham. tvaerminnensis* OER-3-3 (ACSZ00000000.1), *Nematocida parisii* ERTm1 (AEFF00000000.2), *Ne. parisii* ERTm3 (AE0000000000.1), *Nematocida* sp. 1 ERTm2 (AERB00000000.1), *Nosema antheraeae* YY (<http://silkpathdb.swu.edu.cn/silkpathdb/ftpserver>, last accessed September 1, 2014), *Nosema apis* BRL 01 (ANPH00000000.1), *Nosema bombycis* CQ1 (ACJZ00000000.1), *Nosema ceranae* BRL01 (NZ_ACOL00000000.1), *Spraguea lophii* 42_110 (ATCN00000000.1), *Trachipleistophora hominis* (ANCC00000000.1), and *Vavraia culicis* subsp. *floridensis* (AEUG00000000.1). Using the reconstructed consensus TE sequences from *An. algerae*, a TBLASTX (Altschul et al. 1997) was performed (*E* value threshold of $1e^{-5}$ and low-complexity filter disabled) against microsporidian genomes. For each species, TE consensus were then reconstruct as described for *An. algerae* (see above, see table 1). To identify highly variable or additional subclass of TEs, an exhaustive search of TEs has been carried out with TransposonPSI software (<http://transposonpsi.sourceforge.net/>, last accessed September 1, 2014).

Reference Sequences of TEs

Phylogenetic analyses were performed using different eukaryotic protein sequences from reference TE elements obtained from the Repbase database (Jurka 2000) (supplementary table S3, Supplementary Material online). We performed BLASTN searches of each *An. algerae* consensus on the GenBank databases to add other TE sequences for the different tree reconstructions (supplementary table S4, Supplementary Material online). We used *piggyBac* previously described sequences (Sarkar et al. 2003; Pan et al. 2013) (supplementary table S5, Supplementary Material online). We used the ISFinder database (Siguiet et al. 2006) to retrieve bacterial sequence for the *Merlin* phylogenetic analysis.

Domain Detection

The protein domains of each consensus were determined using the Pfam database version 27.0 (March 2013, 14,831 families; <http://pfam.sanger.ac.uk/>, last accessed September 1, 2014) (Punta et al. 2012) and the batch web CD-search tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>, last accessed September 1, 2014) (Marchler-Bauer et al. 2011).

In Silico Confirmation

TEs representing novel phylogenetic incongruences were validated in silico as being present in a contig belonging to the host genome rather than a contaminant. Most TEs are present in multiple copies in the genome, in such cases contigs were selected based on the proximity of microsporidian coding sequences to TEs. Paired-end reads from *Schmidtea mediterranea* and *Dendroctonus ponderosae* were mapped using Geneious (Geneious version R7 available from <http://www.geneious.com/>, last accessed September 1, 2014) against contigs harboring TEs (Dpon, *Mariner*12, *Merlin*7, 10, 2, and 4) and the nucleotide coverage was plotted to validate the presence of TE in the respective host genome (supplementary fig. S5A–F, Supplementary Material online). For the TEs of *No. apis* and *Ap. florea*, reads consisting of mate pairs were mapped against contigs to validate the assembly of contigs (supplementary fig. S5H, Supplementary Material online).

Tree Reconstruction and Sequence Analysis

For each superfamily, the protein sequences were aligned using MAFFT version 6 (Katoh et al. 2002). Uninformative columns in each of the alignments were removed using the trimAl algorithm (Capella-Gutierrez et al. 2009). In order to determine the amino acid evolution model to be used in our phylogenetic analysis, we analyzed each alignment with ProtTest (Darriba et al. 2011). This revealed the models LG+I Γ (LTR retrotransposons), LG+I+I Γ (*Mariner*/Tc1), Blosum62+I+I Γ (*Merlin*), and VT+I Γ (*piggyBac*) to best explain our data. Maximum-likelihood analysis was performed using PHYML v3.0 (Guindon et al. 2010) with 100 bootstrap replicates, whereas Bayesian analysis was performed using MrBayes v3.2.1 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) for 5,000,000 generations and a burnin of 25%. In order to use the LG model for Bayesian analysis, we obtained the latest development version r851 of MrBayes (<http://sourceforge.net/p/mrbayes/>, last accessed September 1, 2014).

For the LTR-retrotransposon phylogenetic analyses, 50 complete consensus sequences and 10 incomplete consensus sequences that corresponded to nearly complete ORFs of polyproteins were used. Other microsporidian polyproteins consensus sequences were also included (12 consensus sequences from *No. bombycis*, 13 from *Ed. aedis*, 4 from *Ne. parisii*, 7 from *No. antheraeae*, 3 from *Nematocida* sp., 1 from *No. ceranae*, and 3 from *Sp. lophii*) as well as LTR-retrotransposon polyproteins and Pol proteins representative of the *Ty3/gypsy* and *Ty1/copia* groups (supplementary tables S3 and S4, Supplementary Material online).

For the *Merlin* phylogenetic analysis, 82 potentially complete consensus protein sequences over the 84 identified in *An. algerae* were selected; those having no complete ORF were removed. Transposase consensus sequences (34 over 36, two sequences were removed as too short), all microsporidian consensus sequences (six consensus sequences from

Table 1

Number of Families for Each TE Class in Microsporidian Species

Microsporidian Species	Genome Size (Mb)	Known Hosts	Non-LTR Retrotransposons (LINE)	LTR Retrotransposons	DNA Transposons				Total
					Helitron	Mariner/ Tc1	Merlin	piggyBac	
<i>Anncalia algerae</i> (Peyrethallade et al. 2012)	23	Mammals, insects	4	97	/	16	120	3	240
<i>Edhazardia aedis</i> ^a (Williams et al. 2008)	not defined	Mosquitoes	4	28	/	/	1	/	33
<i>Encephalitozoon cuniculi</i> (Katinka et al. 2001)	2.9	Mammals	/	/	/	/	/	/	/
<i>Encephalitozoon intestinalis</i> (Corradi et al. 2010)	2.3	Mammals	/	/	/	/	/	/	/
<i>Encephalitozoon hellem</i> (Pombert et al. 2012)	2.5	Mammals, birds	/	/	/	/	/	/	/
<i>Encephalitozoon romaleae</i> (Pombert et al. 2012)	2.5	Insects	/	/	/	/	/	/	/
<i>Enterocytozoon bieneusi</i> (Akiyoshi et al. 2009; Keeling et al. 2010)	<6	Humans	/	/	/	/	/	/	/
<i>Hamiltosporidium tvaerminensis</i> (Corradi et al. 2009)	≤24.2	Daphnia	12	5	4	1	/	3	25
<i>Nematocida parisii</i> (Cuomo et al. 2012)	<4.1	Nematodes	/	4	/	1	/	1	6
<i>Nematocida</i> sp. (Cuomo et al. 2012)	4.7	Nematodes	1	6	/	1	/	/	8
<i>Nosema antheraeae</i> (Pan et al. 2013)	9.3–9.5	Insects	6	7	/	6	4	1	24
<i>Nosema apis</i> (Chen et al. 2013)	8.5	Insects	15	5	/	/	/	5 ^b	25
<i>Nosema bombycis</i> (Pan et al. 2013)	15–16	Insects	11	14 ^c	1	15 ^d	9	7	57
<i>Nosema ceranae</i> (Cornman et al. 2009)	<7.86	Insects	4	3	3	1	6	5	22
<i>Spraguea lophii</i> (Campbell et al. 2013)	6.2–7.3	Fishes	1	3	/	2	6	/	12
<i>Trachipleistophora hominis</i> (Heinz et al. 2012)	11.6	Humans, mosquitoes	9	1	/	/	/	1	11
<i>Vavraia culicis</i> ^a	6.12	Mosquitoes	/	1	1	/	/	1	3

^aData from the Microsporidia Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>, last accessed September 1, 2014).

^bThat were all already described in GenBank.

^cIncluding eight that were already described in GenBank.

^dIncluding two that were already described in GenBank.

No. ceranae, four from *Sp. lophii*, nine from *No. bombycis*, four from *No. antheraeae*, one from *Ed. aedis*) as well as several transposase proteins from reference *Merlin* elements from various organisms were also included (supplementary table S3, Supplementary Material online).

To build the *Mariner/Tc1* phylogenetic tree, 15 protein consensus sequences from *An. algerae* *Mariner/Tc1* elements and the one described as member of the *Tc5* family were selected as well as consensus sequences reconstructed for the other microsporidian species (15 consensus sequences from *No.*

bombycis, 1 from *Sp. lophii*, 5 from *No. antheraeae*, and 1 from *No. ceranae*) and reference elements from various organisms (supplementary tables S3, S4, and S6, Supplementary Material online).

To reconstruct the evolutionary history of the *piggyBac* superfamilies, the three consensus sequences identified in *An. algerae*, the proteins from the consensus sequences identified in other microsporidian species (seven consensus sequences from *No. bombycis*, one from *T. hominis*, one from *No. antheraeae*, and three from *No. apis*) and 121 protein sequences from

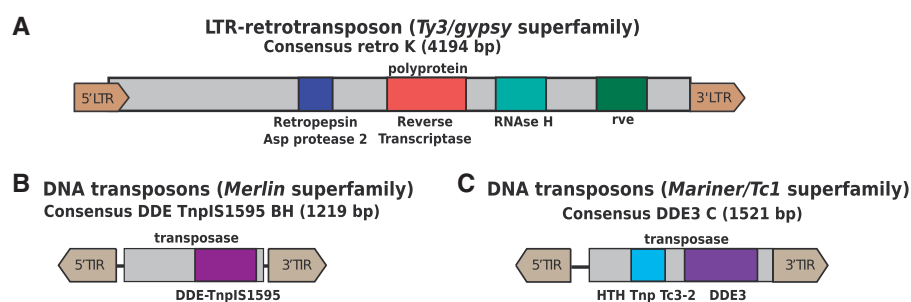


FIG. 1.—Structure of representative complete consensus sequences from the *Ty3/gypsy*, *Merlin*, and *Mariner/Tc1* superfamilies detected in the genome of *Anncalia algerae*. (A) Structure of a *Ty3/gypsy* LTR retrotransposon; (B) structure of a *Merlin* DNA transposon; (C) structure of a *Mariner/Tc1* DNA transposon.

various organisms (supplementary tables S3, S4, and S6, Supplementary Material online) corresponding to reference elements and also to *piggyBac*-derived genes were used.

Phylogenetic inconsistencies of TEs clustered with homologs from very distantly related species were confirmed computing Ks values. We retrieved 26–43 orthologous genes between Microsporidia and involved metazoans to compute the mean Ks values using seqinR (Charif et al. 2005). Putative HT sequences sharing over 90% nucleotidic identity with metazoans or involving poorly annotated genomes were not considered for Ks calculations.

Results

TEs Can Be Very Diverse in Microsporidian Genomes

Analyses of the *An. algerae* genome, identified a diverse collection of TEs, and consensus sequences could be reconstructed for a total of 97 LTR retrotransposons, four non-LTR retrotransposons, and 139 DNA transposons (from the superfamilies' *Mariner/Tc1*, *piggyBac*, and *Merlin*) (table 1; supplementary table S1 and file S1, Supplementary Material online). Representative structures of each superfamily for which complete consensus sequences were reconstructed are shown on figure 1. Because of the highly fragmented state of the *An. algerae* genome, only 50 of the 97 different LTR-retrotransposon consensus sequences could be fully reconstructed (i.e., with LTRs at both extremities and a potentially complete coding sequence; fig. 1A), whereas others were identified based on the presence of partial sequences or complete integrase domain (*rve*). For non-LTR retrotransposons, a total of four distinct families could be found, all of which encode for a specific reverse transcriptase CDD domain cd01650. In the case of the *Merlin* superfamily (DNA transposon), 120 consensus sequences could be reconstructed, 84 of which consisted in complete sequences with characteristic TIRs and a transposase coding sequence (880 bp on average). All of these 84 transposases displayed the DDE_Tnp_IS1595 domain typical of ISXO2-like transposases (fig. 1B). For The *Mariner/Tc1* superfamily of DNA transposons, 16 different consensus

sequences could be reconstructed, 12 of them were complete based on the presence of identifiable TIRs at both extremities and a complete transposase coding gene (fig. 1C). With one exception, transposases displayed the two protein domains: A “helix-turn-helix” domain that specifies DNA binding and DNA recognition domain of the *Tc3* transposase (HTH_tnp_Tc3-2), and a DDE-3 domain characteristic from DDE transposase displaying the carboxylate residues responsible for the endonuclease activity of the protein (fig. 1C). The one exception included a transposase with a “helix-turn-helix” domain characteristic of *Tc5* family (HTH_Tnp_Tc5) linked to a DDE-1 endonuclease activity domain. Finally, we also reconstructed three consensus sequences corresponding to *piggyBac* elements, all of which encoded potentially complete transposase genes which displayed the domain DDE_Tnp_1_7 typical of *piggyBac* transposases, but for which no TIRs could be detected. The copy number of each family was also investigated along the *An. algerae* genome revealing that LTR retrotransposons and *Merlin* DNA transposons represent the most abundant families in this species (supplementary table S2, Supplementary Material online). Importantly, the results obtained using the same methodology based on publicly available data from two other *An. algerae* strains (NCBI [National Center for Biotechnology Information] BioProjects PRJNA188095 and PRJNA188094) resulted in very similar findings.

Our searches for TEs were also expanded to all 16 available genome sequences using two independent approaches (table 1). Specifically, all different consensus sequences retrieved from *An. algerae* were used as queries for BLAST-based searches against the 16 microsporidian genomes (see Materials and Methods), and this approach was complemented by a TransposonPSI analysis of these genomes (<http://transposonpsi.sourceforge.net/>, last accessed September 1, 2014) (table 1). These inspections revealed the presence of previously unrecognized TEs, with ORFs encoding for a helitron helicase-like domain (Pfam domain: 14214) in *No. bombycis*, *No. ceranae*, *Ham. tvaerminnensis*, and *V. culicis*. In total, our exploration of other available microsporidian

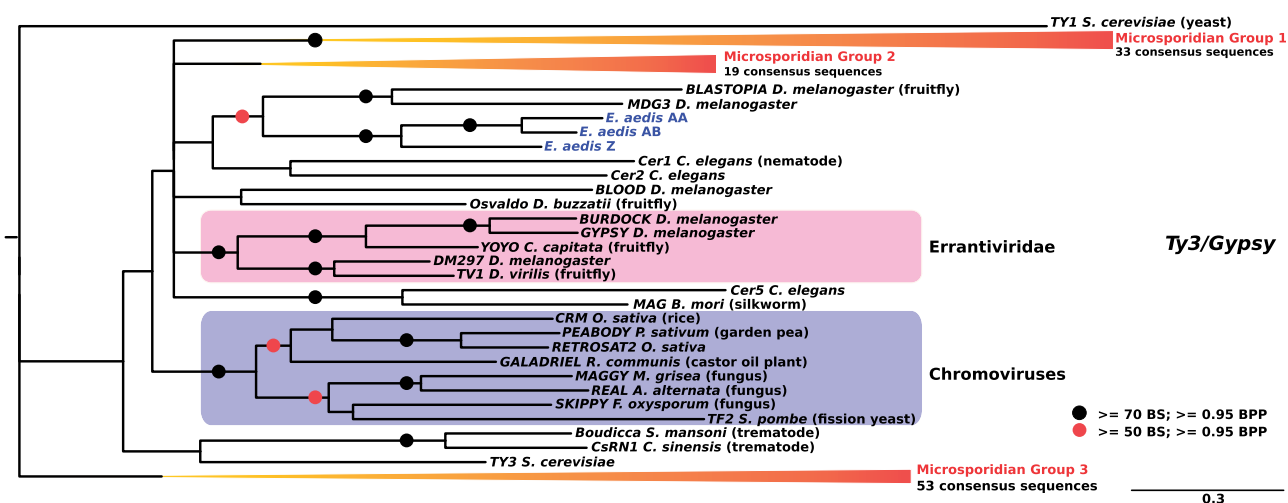


Fig. 2.—Phylogenetic tree of the LTR-retrotransposon class. Tree topology obtained using Bayesian analysis on the Pol proteins and rooted by the *Ty1* reference element from yeast. Black circles highlight nodes with bootstrap support (BS) higher than 70% and bayesian posterior probability (BPP) values higher than 0.95, whereas red circles indicate BS higher than 50% and BPP values higher than 0.95. Absence of red and black circles indicates BPP values above 0.50. The three groups of microsporidian sequences are indicated by the red collapsed clades. For the uncollapsed version of the tree, see [supplementary figure S1, Supplementary Material](#) online. Three consensus sequences from the microsporidia *Edhazardia aedis* are indicated in blue. Colored frames represent the well-identified genera corresponding to Errantiviridae and Chromoviruses.

genomes resulted in the identification of 33, 25, 24, 25, 57 and 22 TE families in the *Ed. aedis*, *Ham. tvaerminnensis*, *No. antheraeae*, *No. apis*, *No. bombycis* and *No. ceranae* genomes, respectively, whereas less than 15 families in total were detected in the other species (table 1).

Phylogenetic Reconstructions Reveal Microsporidia-Specific Clades of TEs

The evolutionary histories of the four largest microsporidian TE superfamilies were investigated using Maximum Likelihood and Bayesian analyses of their complete consensus sequences. These confirmed that the vast majority of microsporidian LTR retrotransposons correspond to elements from the *Ty3/gypsy* group (fig. 2 and [supplementary fig. S1, Supplementary Material](#) online), which separate into three main groups that seem to have specifically diversified in microsporidia (i.e., they do not contain elements from other eukaryotes; see, e.g., group 1 in [supplementary fig. S1, Supplementary Material](#) online). *Anncalia algerae* LTR retrotransposons displayed a pattern of extreme diversification within three main groups (39 sequences in group 3, 13 and 8 sequences in group 1 and 2, respectively). A similar pattern of diversification is also found in *Ed. aedis*, although the total number of sequences is much smaller than in *An. algerae* (28 different families; table 1). For the *Merlin* superfamily, microsporidian sequences clustered into eight phylogenetic groups, three of which contained 72% of all consensus sequences (fig. 3 and [supplementary fig. S2, Supplementary Material](#) online), suggesting that diversity in *Merlin*-like sequences in *An. algerae* results from several

independent events of diversification within each group. The four classic groups from the *Mariner/Tc1* superfamily (*Mariner*, *Tc1*, *MaT*, and *pogo*) are well supported in the phylogenetic tree (fig. 4 and [supplementary fig. S3, Supplementary Material](#) online). Nine consensus sequences of *An. algerae* appeared to be part of the *Tc1* group along with other sequences from other microsporidia, whereas the remaining six, along with other microsporidian sequences, formed an independent group at the basis of *Mariner*, *Tc1*, and *MaT* groups but also independent of the *pogo* group. The *An. algerae* *Tc5* consensus sequence (*An. algerae* *Tc5* DDE1) and the one identified in *No. antheraeae* clustered inside the *pogo* group, though not together (fig. 4 [supplementary fig. S3, Supplementary Material](#) online).

Phylogenetic Incongruences for TEs Identified in Microsporidian and Metazoan Genomes

Our phylogenetic reconstruction revealed 17 instances where microsporidian TEs clustered with homologs from very distantly related species, notably arthropods and platyhelminthes, or vice versa. Nine of these are strongly supported (Bootstraps values [BS] and Bayesian Posterior Probability [BPP] support over 95%) by two or more nodes, and four are also backed by an extensive sequence identity. Compelling cases of phylogenetic incongruence include two *Merlin* DNA transposons from the planarian *Sc. mediterranea* (*Merlin7* and *Merlin10* in fig. 3) that cluster within clades otherwise exclusively composed of elements from *An. algerae*, and others involving *piggyBac* clustered with homologs

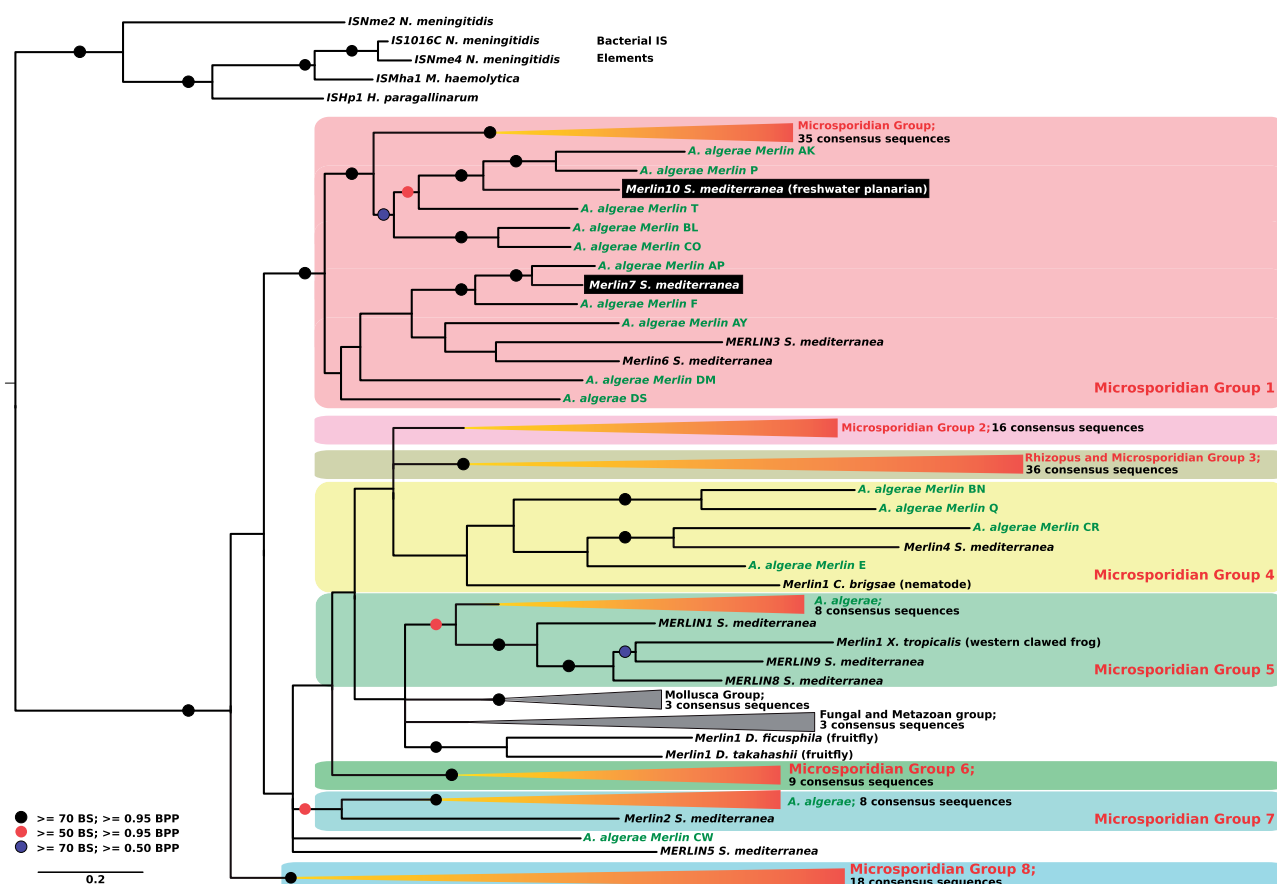


FIG. 3.—Phylogenetic tree of the Merlin superfamily. Tree topology was obtained using Bayesian analysis on transposase proteins and rooted by bacterial IS elements. Black circles highlight nodes with bootstrap support (BS) higher than 70% and bayesian posterior probability (BPP) values higher than 0.95, red circles indicate BS higher than 50% and BPP values higher than 0.95, and blue circles indicate BS higher than 70% and BPP values higher than 0.50. Absence of red, black, and blue circles indicates BPP values above 0.50. The eight Microsporidian groups are indicated by coloured frames and collapsed red clades. For the uncollapsed versions of the tree, see [supplementary figure S2, Supplementary Material](#) online. Several consensus sequences from the microsporidia *An. algerae* are indicated in green. Putative HT sequences are shown in black rectangles.

from insects (e.g., *An. algerae-piggyBac-A* and *An. algerae-piggyBac-B*; [fig. 5](#) and [supplementary fig. S4, Supplementary Material](#) online). Among these, the sequence *An. algerae-piggyBac-B* is particularly intriguing, as it shares over 98.86% of nucleotide identity with a sequence from the Pine beetle *D. ponderosae*; suggesting their very recent divergence. Other phylogenetic inconsistencies include some previously found by others, (i.e., a *piggyBac* element from *T. hominis* related to an ant *Harpegnathos saltator*, [fig. 5](#) [Heinz et al. 2012] as well as three *No. apis* sequences [*N. apis* 1,2,3; [fig. 5](#) and [supplementary fig. S4, Supplementary Material](#) online]). These sequences cluster and share an identity higher than expected with homologs from different bee species (respectively 94.18% and 99.20% nucleotide identity with the *Ap. florea*, and 90.32% identity with the *Megachile rotundata*; [fig. 5](#)). The number of synonymous substitutions per synonymous site (Ks) was computed for TEs with phylogenetic inconsistencies but

sharing intermediate sequence identity with metazoan homologs. Additional evidence of HTs were found for *piggyBac* elements from *No. bombycis* (mean Ks [*Camponotus floridanus* genes vs. *No. bombycis* genes] = 9.03 ± 2.52 vs. Ks [*N. bombycis E* vs. *C. floridanus*] = 1.92; mean Ks [*M. rotundata* genes vs. *No. bombycis* genes] = 8.17 ± 3.37 vs. Ks [*N. bombycis B* vs. *M. rotundata 7*] = 4.02 and Ks [*N. bombycis G* vs. *M. rotundata 7*] = 2.65) and *T. hominis* (mean Ks [*Har. saltator* genes vs. *T. hominis* genes] = 9.51 ± 1.81 vs. Ks [*T. hominis* vs. *Har. saltator 4*] = 0.19).

Manual inspections of contigs confirmed that all reported HTs were surrounded by genes arisen from vertical descent, and were located within contigs that were properly assembled ([supplementary fig. S5, Supplementary Material](#) online). All *An. algerae* TEs involved in phylogenetic inconsistencies were also found in other *An. algerae* strains that were cultured, sequenced, and assembled by others (see Materials and Methods).

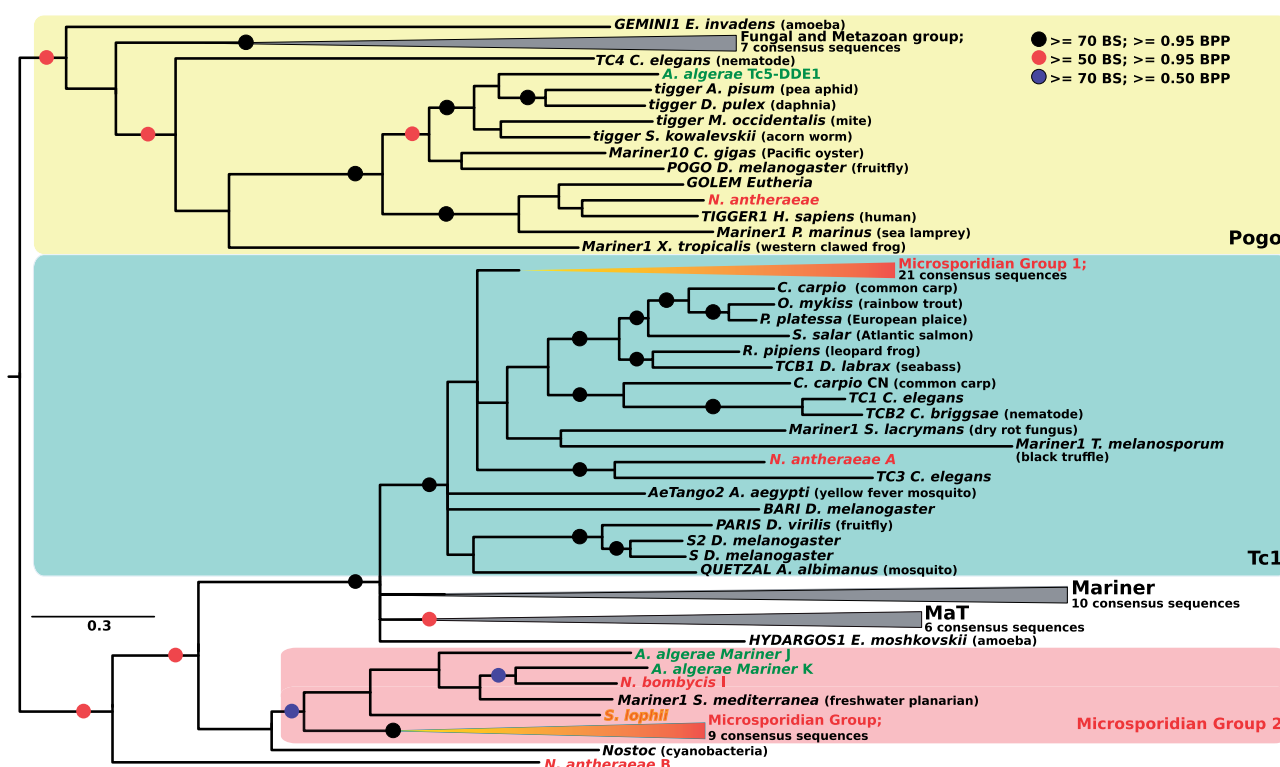


FIG. 4.—Phylogenetic tree of the *Mariner/Tc1* and *pogo* superfamilies. Tree topology was obtained using Bayesian analysis on transposase proteins and rooted by elements from the *pogo* superfamily. Black circles highlight nodes with bootstrap support (BS) higher than 70% and bayesian posterior probability (BPP) values higher than 0.95, red circles indicate BS higher than 50% and BPP values higher than 0.95, and blue circles indicate BS higher than 70% and BPP values higher than 0.50. Absence of red, black, and blue circles indicates BPP values above 0.50. The four classic groups from the *Mariner/Tc1* superfamily (*Mariner*, *Tc1*, *MaT*, and *pogo*) are represented by colored frames and gray collapsed clades. The two *Microsporidian* groups are represented by red collapsed clades. Some sequences of the *microsporidia* are indicated in different text colors: green for *An. algerae*, red for *No. bombycis* and *No. antheraeae*, and orange for *S. lophii*. For the uncollapsed version of the tree, see [supplementary figure S3, Supplementary Material](#) online.

Discussion

Origin of TE Diversity in the Microsporidia

The different LTR-retrotransposon families we detected in microsporidian genomes are all from a *Ty3/gypsy* group previously described from a wide variety of organisms, such as plants, fungi, and animals (Llorens et al. 2009). Three different subgroups appeared specific to the microsporidian species and independent from the well-described subgroups. The structure of these elements with one polyprotein instead of two ORFs for *gag* and *pol* makes them different from the rest of the *Ty3/gypsy* elements. They could represent the remnant of ancestral forms of LTR retrotransposons thought to have emerged from bacterial DNA transposons (Capy et al. 1996). These elements seem to have been particularly successful in *An. algerae* genome (40.90% of the total identified TE families), such a diversity is not observed in the other microsporidian genomes sequenced to date, even if *No. bombycis* and *Ed. aedis* showed quite large numbers of TEs families (table 1). DNA transposons represent the majority of TE sequences

identified in the microsporidia (57.44% of the total identified TE families in this study), with three superfamilies being characterized (*Mariner/Tc1*, *Merlin*, and *piggyBac* superfamilies). Among the *Mariner/Tc1* elements, one microsporidian group does not appear to belong to any of the already described groups *Mariner*, *Tc1*, and *MaT*. As a cyanobacteria sequence is clustered within this group and as it has been hypothesized that these elements were derived from bacterial IS elements (Capy et al. 1996), this group could correspond to ancestral forms of *Mariner/Tc1* elements. The diversification of TE families indicates that the emergence of new families could be a recurrent process as there is evidence that TEs can be viewed as a mosaic of various elements that arose through recombination process (Capy et al. 1996; Lerat and Capy 1999; Augé-Gouillon et al. 2000). Alternatively, the hypothesis that these new TE families may originate from HTs not already characterized cannot be completely excluded. Hence, the large diversity of some TE families in the *An. algerae* genome could indicate that new TEs can easily be formed or gained in this species and possibly in other microsporidian genomes. This is particularly

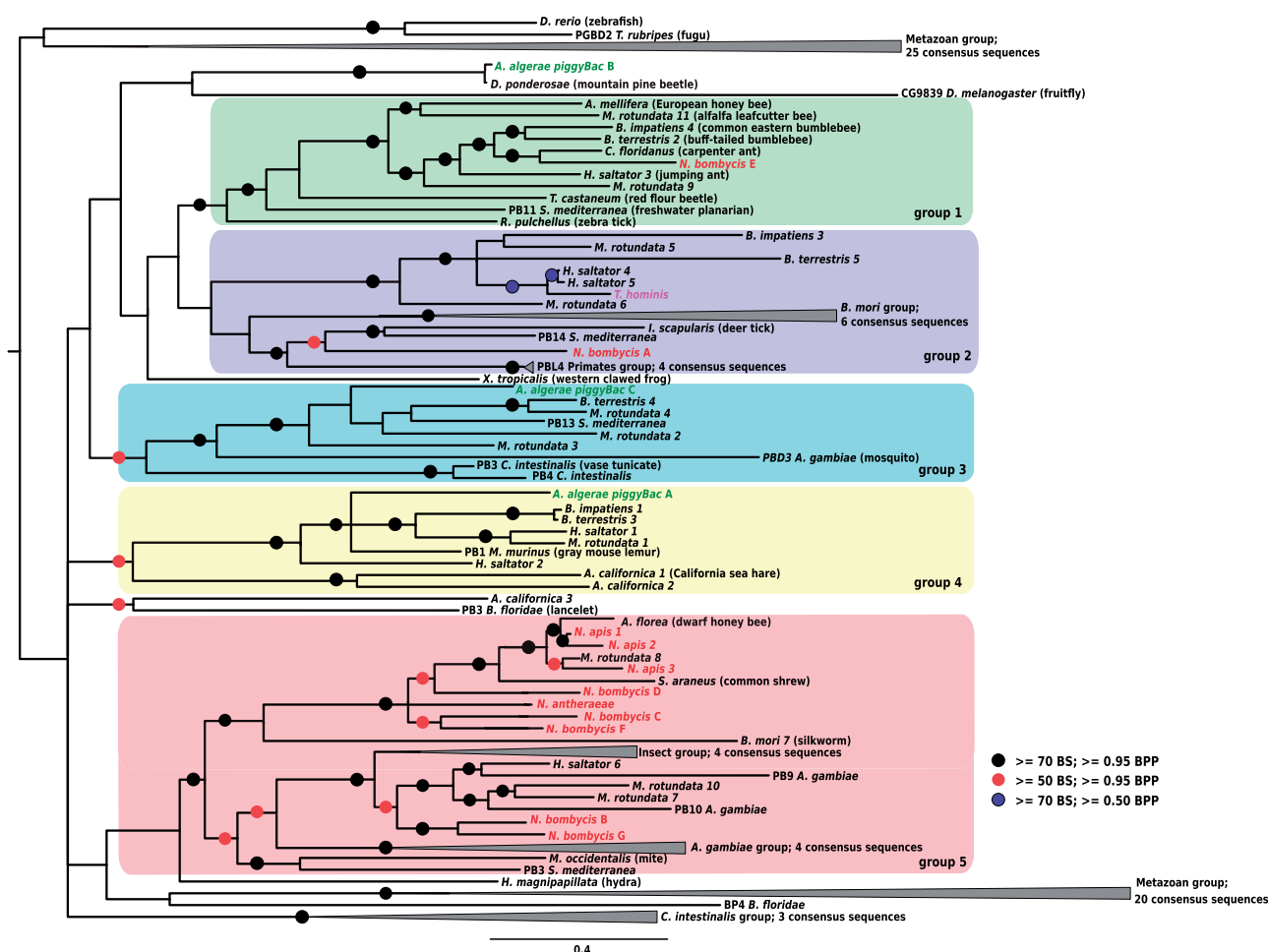


FIG. 5.—Phylogenetic tree of the *piggyBac* superfamily. Tree topology was obtained using Bayesian analysis on transposase proteins and rooted at midpoint. Black circles highlight nodes with bootstrap support (BS) higher than 70% and bayesian posterior probability values higher than 0.95, red circles indicate BS higher than 50% and BPP values higher than 0.95, and blue circles indicate BS higher than 70% and BPP values higher than 0.50. Absence of red, black, and blue circles indicates BPP values above 0.50. Colored frames represent five well supported clades. Some sequences have been groups inside collapsed gray clades. For the uncollapsed version of the tree, see [supplementary figure S4, Supplementary Material](#) online. The consensus sequences of microsporidia appear in text color: green for *An. algerae*, red for *No. bombycis*, *No. apis*, and *No. antheraeae*, and pink for *T. hominis*.

clear in the case of the *Merlin* DNA transposons whose numbers have drastically expanded in *An. algerae*. It has been proposed that the diversity and the size of TE families could be in part due to the population structure of the species where they are found like the population size (Jurka et al. 2011). In this case, the accumulation of TEs could be the result of genetic drift in small populations of these parasites, as microsporidian populations can be subject to genetic bottlenecks like any intracellular organism. Because genetic drift is associated with a decrease in the efficacy of natural selection, it is expected that deleterious mutations, as for example TE insertions, will be fixed in small populations. New TEs insertions could thus be fixed by genetic drift, which would lead to an increase of the genome size in the microsporidian species where they occur and offset genome reduction processes.

Potential Impact of TEs on the Biology and Evolution of Microsporidia

Microsporidia are renowned for the genes they have lost, and genome sequencing of these parasites rarely demonstrates complexity that exceeds that found in free-living microbial eukaryotes. Here, however, we demonstrate that these organisms can harbor exaggerated numbers of TE families; matching those found in distant fungal symbionts and pathogens with genomes that are over twice as large (i.e., the plant symbiont *Laccaria bicolor* with 171 TE families in a 60 Mb genome [Labbe et al. 2012]; the plant pathogen *Puccinia graminis* with 266 families in a 80 Mb genome) (Duplessis et al. 2011). The abundance of these elements in *An. algerae* genome (and to a lesser extent other members of this lineage) may reflect their pivotal role in the ecology and evolution of these parasites, as

these elements are known contributors to genome plasticity in other organisms (Biemont 2010). This plasticity has also been linked with host–parasite interactions in distant relatives, most notably fungal and oomycete plant pathogens, so it is literally possible that TE abundance results in similar adaptive processes in microsporidia (Dean et al. 2005; Amyotte et al. 2012; Raffaele and Kamoun 2012). Recently, a SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell culture) approach allowed the detection of a Pol polyprotein among the parasite proteins during an infection process. A specific microsporidian regulation signal within the putative promoter of this TE suggests its domestication by the microsporidia, which may have provided an advantage in the evolutionary story of *An. algerae* to lure the host innate immune system (Panek et al. 2014). The fact that not all microsporidia share the same pool of TEs is in agreement with previous reports indicating that variation in the amount of TEs largely accounts for differences in genome size within this group—that is, bigger microsporidian genomes harbor more TEs (Williams et al. 2008; Corradi et al. 2009; Corradi and Slamovits 2011; Peyretailade et al. 2012). The identification of many TE families that are exclusive to microsporidia suggests their ancestral presence in these parasites, and many of these now continue to evolve through independent expansions and contractions in the different lineages.

Evidence of Extremely Recent and Bidirectional HTs with Metazoans

Microsporidia benefited from HTs in many ways (reviewed in Selman and Corradi 2011), but to date only two of these have involved TEs (Heinz et al. 2012; Pan et al. 2013). Our study, however, shows that the role of TEs in the HT may have been overlooked in these parasites. Among the 17 phylogenetic incongruences identified, nine could conservatively be attributed to HTs, doubling the number of cases known for microsporidia. These elements appear to have been exchanged with various metazoan taxa, confirming previous reports based on one TE and two protein encoding genes (Selman et al. 2011; Heinz et al. 2012; Pombert et al. 2012). However, the number of cases we identified suggests that genetic exchanges with animals may be more frequent than previously appreciated. Interestingly, a few cases of HTs involved a planarian (*Sc. mediterranea*), a lineage that has never been reported to be infected by microsporidia. Indeed, prior to this study, *An. algerae* was only known to infect human and mosquito. Nevertheless, the very high sequence identity between several TEs from *An. algerae*, and, the very distantly related metazoans *Sc. mediterranea* and *D. penderosae* suggest that the host range of some microsporidian species could be much larger than previously assumed. Host range is probably only partially known and identification of recent HTs could help us to refine it.

Most previous reports of HTs in microsporidia have involved sequences that are rather divergent (between 23% and 62%), suggesting that these events were rather ancient (Slamovits and Keeling 2004; Xiang et al. 2010; Selman et al. 2011; Cuomo et al. 2012; Heinz et al. 2012; Pombert et al. 2012; Nakjang et al. 2013; Pan et al. 2013), but in this study we found several compelling cases of HTs involving sequences sharing between 70% and 98% nucleotide identity. This elevated similarity suggests that microsporidia and metazoans taxa are actively exchanging TEs to this day, and particularly *piggyBac* elements. We also found cases where TEs appeared to have been donated by the microsporidia rather than being received. Our conservative analyses revealed two such cases, namely *Merlin7* and *Merlin10* (fig. 3), both of which involved the planaria *Sc. mediterranea*. Interestingly, this species has been documented to be involved in HTs in other occasions with Lepidoptera and vertebrates (Novick et al. 2010; Lavoie et al. 2013), so an intriguing possibility is that latter HTs were mediated by a microsporidium and facilitated by the nonisolated germ-line of *Sc. mediterranea* (Schaack et al. 2010). If the phylogenetic inconsistencies we observed are real, and not the result of biases introduced by taxonomical sampling, the capacity of microsporidia to occasionally donate genetic material to other organisms would underscore their potential to act as “vectors” of genetic information in many environments, revealing completely new aspects of their biology with far-reaching consequences for our understanding of their biology.

Supplementary Material

Supplementary file S1, figures S1–S5, and tables S1–S6 are available at *Genome Biology and Evolution* online (<http://www.gbe.oxfordjournals.org/>).

Acknowledgments

This study was financially supported by the French “Direction Générale de l’Armement” (DGA) to N.P. N.C. is a Fellow of the Integrated Microbial Biodiversity Program of the Canadian Institute for Advanced Research (CIFAR-IMB). His work was supported by Discovery grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. The authors are grateful to Jason Slot and Thomas Richards for critical discussion of an earlier version of the manuscript. N.C., P.P., E.P., and E.L. planned the study. N.P., A.P., E.P., and E.L. performed the analyses. N.P., A.P., N.C., E.P., and E.L. wrote the manuscript, with revisions and contributions by C.G., V.P., A.B., J.P., H.E.A., D.B., E.B., C.V., and P.P. All authors read and approved the final manuscript. All authors declare no competing interests.

Literature Cited

Akiyoshi DE, et al. 2009. Genomic survey of the non-cultivable opportunistic human pathogen, *Enterocytozoon bieneusi*. *PLoS Pathog.* 5: e1000261.

- Altschul SF, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Amoyte SG, et al. 2012. Transposable elements in phytopathogenic *Verticillium* spp.: insights into genome evolution and inter- and intra-specific diversification. *BMC Genomics* 13:314.
- Auge-Gouillon C, Notareschi-Leroy H, Abad P, Periquet G, Bigot Y. 2000. Phylogenetic analysis of the functional domains of mariner-like element (MLE) transposases. *Mol Gen Genet.* 264:506–513.
- Bailly-Bechet M, Haudry A, Lerat E. 2014. “One code to find them all”: a perl tool to conveniently parse RepeatMasker output files. *Mob DNA.* 5:13.
- Belkorchia A, et al. 2008. In vitro propagation of the microsporidian pathogen *Brachiola algerae* and studies of its chromosome and ribosomal DNA organization in the context of the complete genome sequencing project. *Parasitol Int.* 57:62–71.
- Biemont C. 2010. A brief history of the status of transposable elements: from junk DNA to major players in evolution. *Genetics* 186:1085–1093.
- Campbell SE, et al. 2013. The genome of *Spraguea lophii* and the basis of host-microsporidian interactions. *PLoS Genet.* 9:e1003676.
- Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T. 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25:1972–1973.
- Capy P, Vitalis R, Langin T, Higuier D, Bazin C. 1996. Relationships between transposable elements based upon the integrase-transposase domains: is there a common ancestor? *J Mol Evol.* 42: 359–368.
- Charif D, Thioulouse J, Lobry JR, Perriere G. 2005. Online synonymous codon usage analyses with the ade4 and seqinR packages. *Bioinformatics* 21:545–547.
- Chen Y, et al. 2013. Genome sequencing and comparative genomics of honey bee microsporidia, *Nosema apis* reveal novel insights into host-parasite interactions. *BMC Genomics* 14:451.
- Comman RS, et al. 2009. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees. *PLoS Pathog.* 5: e1000466.
- Corradi N, Haag KL, Pombert JF, Ebert D, Keeling PJ. 2009. Draft genome sequence of the Daphnia pathogen *Ooctosporea bayeri*: insights into the gene content of a large microsporidian genome and a model for host-parasite interactions. *Genome Biol.* 10:R106.
- Corradi N, Pombert JF, Farinelli L, Didier ES, Keeling PJ. 2010. The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nat Commun.* 1:77.
- Corradi N, Selman M. 2013. Latest progress in microsporidian genome research. *J Eukaryot Microbiol.* 60:309–312.
- Corradi N, Slamovits CH. 2011. The intriguing nature of microsporidian genomes. *Brief Funct Genomics.* 10:115–124.
- Cuomo CA, et al. 2012. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth. *Genome Res.* 22: 2478–2488.
- Daboussi MJ, Capy P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol.* 57:275–299.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27: 1164–1165.
- Dean RA, et al. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434:980–986.
- Didier ES, Weiss LM, Cali A, Marciano-Cabral F. 2009. Overview of the presentations on microsporidia and free-living amoebae at the 10th International Workshops on Opportunistic Protists. *Eukaryot Cell.* 8: 441–445.
- Duplessis S, et al. 2011. Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 9166–9171.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.
- El Baidouri M, et al. 2014. Widespread and frequent horizontal transfers of transposable elements in plants. *Genome Res.* 24:831–838.
- Fortune PM, Roulin A, Panaud O. 2008. Horizontal transfer of transposable elements in plants. *Commun Integr Biol.* 1:74–77.
- Gilbert C, Schaack S, Feschotte C. 2010a. Mobile elements jump between parasites and vertebrate hosts. *Med Sci (Paris).* 26: 1025–1027.
- Gilbert C, Schaack S, Pace JK 2nd, Brindley PJ, Feschotte C. 2010b. A role for host-parasite interactions in the horizontal transfer of transposons across phyla. *Nature* 464:1347–1350.
- Guindon S, et al. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol.* 59:307–321.
- Hecht MM, et al. 2010. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. *PLoS One* 5:e9181.
- Heinz E, et al. 2012. The genome of the obligate intracellular parasite *Trachipleistophora hominis*: new insights into microsporidian genome dynamics and reductive evolution. *PLoS Pathog.* 8:e1002979.
- Hua-Van A, Le Rouzic A, Maisonhaute C, Capy P. 2005. Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: similarities and differences. *Cytogenet Genome Res.* 110: 426–440.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755.
- Ivanecvic AM, Walsh AM, Kortschak RD, Adelson DL. 2013. Jumping the fine LINE between species: horizontal transfer of transposable elements in animals catalyses genome evolution. *Bioessays* 35: 1071–1082.
- James TY, et al. 2013. Shared signatures of parasitism and phylogenomics unite cryptomycota and microsporidia. *Curr Biol.* 23:1548–1553.
- Jurka J. 2000. Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet.* 16:418–420.
- Jurka J, Bao W, Kojima KK. 2011. Families of transposable elements, population structure and the origin of species. *Biol Direct.* 6:44.
- Katinka MD, et al. 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414: 450–453.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30:3059–3066.
- Keeling PJ, et al. 2010. The reduced genome of the parasitic microsporidian *Enterocytozoon bienersi* lacks genes for core carbon metabolism. *Genome Biol Evol.* 2:304–309.
- Labbe J, et al. 2012. Characterization of transposable elements in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *PLoS One* 7:e40197.
- Laha T, et al. 2007. The bandit, a new DNA transposon from a hookworm-possible horizontal genetic transfer between host and parasite. *PLoS Negl Trop Dis.* 1:e35.
- Lavoie CA, Platt RN 2nd, Novick PA, Counterman BA, Ray DA. 2013. Transposable element evolution in *Heliconius* suggests genome diversity within Lepidoptera. *Mob DNA.* 4:21.
- Lerat E, Capy P. 1999. Retrotransposons and retroviruses: analysis of the envelope gene. *Mol Biol Evol.* 16:1198–1207.
- Llorens C, Munoz-Pomer A, Bernad L, Botella H, Moya A. 2009. Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees. *Biol Direct.* 4:41.
- Loreto EL, Carareto CM, Capy P. 2008. Revisiting horizontal transfer of transposable elements in *Drosophila*. *Heredity (Edinb)* 100:545–554.
- Marchler-Bauer A, et al. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.* 39: D225–D229.

- Nakjang S, et al. 2013. Reduction and expansion in microsporidian genome evolution: new insights from comparative genomics. *Genome Biol Evol.* 5:2285–2303.
- Novick P, Smith J, Ray D, Boissinot S. 2010. Independent and parallel lateral transfer of DNA transposons in tetrapod genomes. *Gene* 449:85–94.
- Pan G, et al. 2013. Comparative genomics of parasitic silkworm microsporidia reveal an association between genome expansion and host adaptation. *BMC Genomics* 14:186.
- Panek J, et al. 2014. Hijacking of host cellular functions by an intracellular parasite, the microsporidian *Anncalia algerae*. *PLoS One* 9:e100791.
- Peyretailade E, et al. 2012. Annotation of microsporidian genomes using transcriptional signals. *Nat Commun.* 3:1137.
- Pombert JF, et al. 2012. Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:12638–12643.
- Punta M, et al. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 40:D290–D301.
- Raffaele S, Kamoun S. 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nat Rev Microbiol.* 10:417–430.
- Sarkar A, et al. 2003. Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family and related “domesticated” sequences. *Mol Genet Genomics.* 270:173–180.
- Sayers EW, et al. 2011. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 39:D38–D51.
- Schaack S, Gilbert C, Feschotte C. 2010. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. *Trends Ecol Evol.* 25:537–546.
- Selman M, Corradi N. 2011. Microsporidia: horizontal gene transfers in vicious parasites. *Mol Genet Elements.* 1:251–255.
- Selman M, et al. 2011. Acquisition of an animal gene by microsporidian intracellular parasites. *Curr Biol.* 21:R576–R577.
- Siguié P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 34:D32–D36.
- Slamovits CH, Keeling PJ. 2004. Class II photolyase in a microsporidian intracellular parasite. *J Mol Biol.* 341:713–721.
- Smit AFA, Hubley R, Green P. 1996–2010. RepeatMasker Open-3.0. Available from: <http://www.repeatmasker.org>.
- Steglich C, Schaeffer SW. 2006. The ornithine decarboxylase gene of *Trypanosoma brucei*: evidence for horizontal gene transfer from a vertebrate source. *Infect Genet Evol.* 6:205–219.
- Sun C, et al. 2012. LTR retrotransposons contribute to genomic gigantism in plethodontid salamanders. *Genome Biol Evol.* 4:168–183.
- Vavra J, Lukes J. 2013. Microsporidia and “the art of living together”. *Adv Parasitol.* 82:253–319.
- Wallau GL, Ortiz MF, Loreto EL. 2012. Horizontal transposon transfer in eukarya: detection, bias, and perspectives. *Genome Biol Evol.* 4: 689–699.
- Wang S, Zhang L, Meyer E, Bao Z. 2010. Genome-wide analysis of transposable elements and tandem repeats in the compact placozoan genome. *Biol Direct.* 5:18.
- Wicker T, et al. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet.* 8:973–982.
- Williams BA, et al. 2008. Genome sequence surveys of *Brachiola algerae* and *Edhazardia aedis* reveal microsporidia with low gene densities. *BMC Genomics* 9:200.
- Xiang H, et al. 2010. A tandem duplication of manganese superoxide dismutase in *Nosema bombycis* and its evolutionary origins. *J Mol Evol.* 71:401–414.
- Yoshiyama M, et al. 2001. Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid. *Mol Biol Evol.* 18: 1952–1958.
- Zhang HH, Feschotte C, Han MJ, Zhang Z. 2014. Recurrent horizontal transfers of chapaev transposons in diverse invertebrate and vertebrate animals. *Genome Biol Evol.* 6:1375–1386.

Associate editor: Josefa Gonzalez

Résumé

Lors de la mise en place d'une interaction hôte-parasite, les principales barrières à franchir sont les mêmes quel que soit l'hôte considéré. Il faut que le parasite rencontre l'hôte puis qu'il soit capable d'échapper à ses systèmes de défenses. Pour cela, au-cours de la coévolution, les parasites ont ainsi développé des stratégies moléculaires leur permettant de pirater les réseaux de l'hôte, menant à l'établissement d'un dialogue moléculaire. Les microsporidies, qui sont des parasites intracellulaires obligatoires, ont, du fait de leur forte dépendance vis-à-vis de leur hôte, probablement développé des stratégies très poussées de piratage. L'objectif de cette thèse a été d'initier le décryptage du dialogue moléculaire qui s'établit entre une microsporidie et son hôte à deux niveaux d'intégration. Au niveau cellulaire, l'étude de la réponse protéique de cellules fibroblastiques humaines à l'infection par *Anncaliia algerae* a permis de suggérer l'existence d'une stratégie originale de leurre de l'hôte grâce à l'expression d'un élément transposable. Au niveau tissulaire, l'étude de la réponse protéique d'intestin d'abeilles infectées par *Nosema ceranae* a révélé une perturbation de l'homéostasie du tissu intestinal pouvant être à l'origine d'un impact négatif de l'infection sur le taux de renouvellement de l'épithélium. Un suivi du taux de multiplication des cellules souches intestinales lors d'une cinétique d'infection nous a permis de conforter cette hypothèse. Le suivi de l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation contrôlant ce taux de renouvellement a confirmé une perturbation de l'homéostasie intestinale de l'abeille. Cependant, les mécanismes par lesquels les microsporidies arrivent à se développer chez leurs hôtes ne sont pas connus et méritent d'être explorés.

Mots-clés : Microsporidies, *Anncaliia algerae*, *Nosema ceranae*, protéomique, dialogue moléculaire

Abstract

Within the host-parasite interaction, the parasite need to cross the same barriers whatever the host considered. First, the parasite has to meet its host and to escape its defense systems. For this purpose, the parasites have developed, during coevolution, molecular strategies allowing them to hijack the host networks, leading to the set-up of a real molecular crosstalk. Microsporidia, which are obligate intracellular parasites, have probably developed very sophisticated strategies to hijack their host cell functions as they are strongly dependent to their hosts. The objective of this thesis was to pave the way to the deciphering of the molecular dialogue that takes place during the interaction between a microsporidia and its host, at two different integration levels. At the cellular level, the study of the proteome response of human fibroblast cells to the infection by *Anncaliia algerae* allowed us to suggest the existence of a lure strategy used by *A. algerae* to bypass the host response. At the tissue level, the study of the midgut proteome response of honeybees infected by *Nosema ceranae* revealed a disturbance of the intestinal homeostasis. These results lead us to the hypothesis of a negative impact of the infection on the midgut epithelium renewal rates. This assumption was confirmed by a monitoring of the multiplication rate of intestinal stem cells during a kinetics of infection and of the expression of genes implicated in the signaling pathways controlling this renewal. However, the underlying mechanisms allowing microsporidia to develop in hosts are not known and deserve to be explored.

Keys words: Microsporidies, *Anncaliia algerae*, *Nosema ceranae*, protéomique, dialogue moléculaire

